

Charakterisierung eines pharmazeutischen Antikörpers und geeigneter Aufreinigungsmethoden

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Rajko Alexander Winkler

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Herr Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ulrich Panne

2. Prof. Dr. Michael W. Linscheid

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2015

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 05.01.2015

Rajko Winkler

Danksagung

Ich möchte mich zu allererst bei Professor Ulrich Panne für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas bedanken, darüber hinaus bei Professor Michael W. Linscheid für die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis diese Arbeit anfertigen zu können. Beiden danke ich für die vielen Freiheiten in der Bearbeitung des Themas. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Norbert Jakubowski für die Betreuung und Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit sehr herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank geht an den ganzen Arbeitskreis der Analytischen und Umweltchemie der Humboldt-Universität zu Berlin für das gute Arbeitsklima und die guten Arbeitsbedingungen. Dabei gilt ein großer Dank im Speziellen Dr. Sebastian Beck, Dr. Ulrike Hochkirch, Dr. Gunnar Schwarz und Lena Ruhe für die vielen hilfreichen Diskussionen im Rahmen der Arbeit. Natürlich möchte ich auch dem ganzen Fachbereich 1.1 der Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung danken, allen voran Dr. Larissa Müller und Sandra Techritz für die Unterstützung bei der Markierung von Antikörpern, bzw. der Zurverfügungstellung markierter Antikörper sowie der Hilfe bei den Bradford-Assay Messungen. Ganz herzlicher Dank gilt auch Gerrit Hermann, Evelyn Rampler und Professor Gunda Köllensberger von der Universität für Bodenkultur in Wien für die hervorragende Betreuung und Hilfe bei der Einarbeitung in die Schwefelmessungen während meines Aufenthaltes in Wien. Außerdem möchte ich Franziska Rudolph und Dr. Steffen Weidner aus dem Fachbereich 1.4 der BAM für die sehr wertvolle Hilfe bei den Polymermessungen danken. Mein Dank gilt auch den Projektpartnern des AbCAP-Projektes, allen voran Patricia Latza und Professor Thomas Schrader, Professor Mathias Ulbricht und Professor Börje Sellergren. Weiterhin möchte ich Dr. Kevin Pagels, Johanna Hofmann und Melanie Göth vom Fritz-Haber-Institut für die Möglichkeit zur Messung an einem Synapt G2-S danken.

Danken möchte ich auch Konstantin Kottrup, Antti Senf und Melanie Göth, die ihre Forschungspraktika bei mir absolviert haben. Des Weiteren gilt mein Dank auch Dr. Karola Lehmann von der Proteome Factory für die Durchführung der zwei-dimensionalen Gelelektrophoresen.

Natürlich möchte ich auch meinen Eltern ganz herzlich danken, die mich immer bei allem nach Kräften unterstützt haben. Zu guter Letzt möchte ich auch Maike Kemper für ihre Hilfe und allzeit vorhandene Unterstützung danken.

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Zielstellung	3
3. Einleitung	4
3.1 Antikörper	4
3.1.1 Allgemeine Strukturen	5
3.1.2 Immunoglobulinklassen	6
3.1.3 Immunoglobulin G	7
3.1.4 Eigenschaften von Immunoglobulinen	9
3.1.5 Herstellung und Anwendungen von Antikörpern	10
3.2 Eingesetzter Antikörper	13
3.2.1 Interleukin-8 (IL-8)	13
3.2.2 Anti-Interleukin-8 (Anti-IL-8)-Antikörper	14
3.3 Antikörperanalyse	14
3.4 Antikörperquantifizierung	18
3.5 Aufreinigungstechniken	19
3.5.1 Polymerbasierte Trennmaterialien	21
3.6 Eingesetzte Analytische Verfahren	26
3.6.1 Massenspektrometrische Methoden	26
3.6.2 Nicht massenspektrometrische Analyseverfahren	31
4. Materialien und Methoden	34
4.1 Materialien	34

4.1.1 Geräte	34
4.1.2 Chromatographische Trennsäulen	35
4.1.3 Chemikalien	35
4.1.4 Puffer	38
4.1.5 sonstige Materialien	38
4.2 Methoden	39
4.2.1 Gelelektrophorese	39
4.2.2 Umpufferung/Entsalzung	39
4.2.3 MALDI-MS-Messungen	40
4.2.4 ESI-MS-Messungen	40
4.2.5 Reduktion von Antikörpern	41
4.2.6 Proteolysen von Antikörpern	42
4.2.7 Antikörperaufreinigung mit Magnetic Beads	43
4.2.8 Antikörpermarkierungen	43
4.2.9 Ionenmobilitätsmassenspektrometrie (IMS) Messungen	45
4.2.10 Dot-Blot und LA/ICP-MS Messungen	45
4.2.11 Antikörperkomplexe	45
4.2.12 Feld-Fluss-Fraktionierungs (FFF) Messungen	46
4.2.13 Dynamische Lichtstreuungen (DLS) Messungen	46
4.2.14 Immobilisierte Antikörper-Polymer-Komplexe	46
4.2.15 Bestimmung des Verhältnisses von Methionin und Cystein	47
4.2.16 Antikörperquantifizierung mittel ICP-MS	48
4.2.17 Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford	49
5. Ergebnisse und Diskussion	50
5.1 MS-basierte Antikörpercharakterisierung	50

5.1.1 Voruntersuchungen	50
5.1.2 Untersuchungen zur Antikörperstruktur mit ESI-MS	64
5.2 Polymerbasierte Trennmaterialien	102
5.2.1 Protein A mimetische Polymere	102
5.3 Antikörperquantifizierung mittels ICP-MS und Schwefelgehalt	109
5.3.1 Bestimmung des Verhältnisses von Methionin und Cystein	109
5.3.2 Antikörperquantifizierung mittel ICP-MS	111
6. Zusammenfassung und Ausblick	116
7. Anhang	118
8. Abbildungsverzeichnis	126
9. Tabellenverzeichnis	130
10. Literaturverzeichnis	131

1. Abkürzungsverzeichnis

2-ME	2-Mercaptoethanol
AA	Essigsäure (acetic acid)
AbCAP	Antikörper-Selektive Materialien zum Downstream Processing (antibody capturing materials for downstream processing)
ACN	Acetonitril
a.i.	Intensität eines MS-Signals (ohne Basislinienkorrektur)
Anti-IL-8	Anti-Interleukin-8 Antikörper
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymethylsäure
cps	Ionen pro Sekunde (counts per seconds)
Da	Dalton (atomare Masseneinheit)
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DLS	Dynamische Lichtstreuung
DPITFB	Dipyridyliodoniumtetrafluoroborat
DPTA	Diethylentriaminpentaessigsäure
DTT	DL-1,4-Dithiothreitol
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI	Elektrosprayionisation
eV	Elektronenvolt
FA	Ameisensäure (formic acid)
F _{ab}	antigenbindendes Fragment (fragment antigen binding)
Fc	kristallisierendes Fragment (fragment crystallizable region)
FFF	Feld-Fluss-Fraktionierung
FIA	Fließinjektionsanalysen
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (high performance liquid chromatography)
ICP	Induktiv gekoppeltes Plasma (inductively coupled plasma)
ICP-QMS	Induktiv gekoppeltes Plasma Quadrupolmassenspektrometer
IL-8	Interleukin-8
IMS	Ionenmobilitätsmassenspektrometrie (ion mobility mass spectrometry)

LA-ICP-MS	Laserablation-ICP-MS
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization)
MeCAT	Metal-coded Affinity Tagging
MeCAT-Mal	2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-propan-amido)-benzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetrayl)-tetraessigsäure
MS	Massenspektrometer
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
Q-ToF	Quadrupol Flugzeit (Quadrupol-Time-of-Flight)
r.int(%)	relative Intensität
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
SA	Sinapinsäure (sinapinic acid)
SAX	starke Anionenaustauscher (strong anion exchange)
<i>p</i> -SCN-Bn-DOTA	2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclo-dodecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEC	Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatography)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure (trifluoroacetic acid)

2. Zielstellung

Antikörper lassen sich in einer Vielzahl von verschiedenen Bereichen anwenden, da es möglich ist, sie hinsichtlich ihres Bindungsverhaltens sehr genau zu designen. Die Verwendung von Antikörpern in der Medizin sowohl für diagnostische als auch therapeutische Anwendungen stellt jedoch sehr hohe Anforderungen an die Analytik. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Qualitätssicherung von äußerster Wichtigkeit.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung und Charakterisierung eines pharmazeutischen Antikörpers. Dazu soll der ausgewählte Modellantikörper mit unterschiedlichen analytischen Techniken untersucht werden, wobei dies zum Großteil mittels ESI-MS geschehen soll.

Im ersten Schritt werden dazu die Parameter für die ESI-MS-Messungen betrachtet und optimiert, um den Antikörper effektiv massenspektrometrisch analysieren zu können. Ausgehend von diesen Erkenntnissen sollte es möglich sein, eine Charakterisierung des Antikörpers durchzuführen, beispielsweise die Bestimmung der Molekülmasse. Bei dieser Charakterisierung wird nicht nur der intakte Antikörper betrachtet, sondern auch verschiedene Fragmente des Antikörpers wie z.B. das F_c -Fragment und die F_{ab} -Fragmente oder auch die verschiedenen Ketten. Weiterhin sollen verschiedene Proteinkomplexe wie beispielsweise Antikörperoligomere betrachtet werden, ebenso wie unterschiedliche Modifikationen des Antikörpers.

Nachdem diese Erkenntnisse gewonnen wurden, sollen Wechselwirkungen des Antikörpers mit Polymermaterialien analysiert werden. Diese polymerbasierten Materialien sollten eine hohe Affinität zu Antikörpern aufweisen und können damit zur Aufreinigung als Alternative zum herkömmlichen, affinitätsbasierten Verfahren mit Protein A dienen. Untersucht werden sollen neben den Polymeren auch deren Komplexe mit dem Antikörper.

Ein weiteres Ziel der Arbeit ist die Entwicklung einer Quantifizierungsstrategie für Antikörper. Diese soll sich, im Gegensatz zu den bisher vorhandenen, auf primäre, rückführbare Standards beziehen. Dazu soll der Schwefelgehalt und über diesen die Antikörperkonzentration bestimmt werden. Genutzt werden soll dazu die ICP-MS. Ein wichtiger Aspekt ist dabei die Möglichkeit, auch Antikörper zu quantifizieren, deren Schwefelgehalt bisher nicht bekannt ist.

3. Einleitung

3.1 Antikörper

Im Jahre 1890 berichteten Behring und Kitasato erstmals von Stoffen, die eine Immunität für Diphtherie erzeugten.^[1, 2] Schon ein Jahr später wurde der Begriff Antikörper geprägt.^[3] Auch etablierte sich bald der Begriff Antigen für die Stoffe, die die Produktion von Antikörpern auslösen bzw. zu deren Bildung führen.^[4] Durch Elektrophorese konnten Tiselius und Kabat im Jahre 1939 in immunisiertem Serum Albumin, α -Albumin, β -Albumin und γ -Albumin trennen. Mittels geeigneter Antigene konnten die γ -Albumine als die Fraktion identifiziert werden, die die Antikörper enthielten.^[5] Aus dem Begriff γ -Albumin entwickelte sich die Bezeichnung Immunglobuline,^[6] wobei Immunglobuline als eine Gruppe globulärer Proteine definiert sind, zu denen Antikörper und Moleküle mit antikörperartiger Struktur gehören.^[7]

Das Immunsystem, das den Organismus vor Angriffen durch Pathogene schützt, besteht aus unterschiedlichen Komponenten der angeborenen und der erworbenen Immunität. Die angeborene Immunität, auch nicht spezifische Immunität genannt, bedarf keines vorherigen Kontaktes mit entsprechenden Pathogenen um zu funktionieren. Wichtige Teile des Immunsystems sind die Haut und Zellmembranen, die als physische Barrieren dienen. Darüber hinaus besteht es aus den Mikro- und Makrophagen, die Erreger töten und verdauen, den Granulozyten, die vor allem durch toxische Substanzen Erreger abtöten, und aus den natürlichen Killerzellen. Dies sind Lymphozyten, die Tumorzellen töten bzw. Zellen, die infiziert wurden und die durch Antikörper erkannt und markiert wurden.^[8-10] Die erworbene Immunität erzeugt eine spezifische Antwort auf die Erreger. Es gibt hierbei die B- und T-Lymphozyten. Während die T-Zellen die Erreger durch ihre eigenen Antigenrezeptoren erkennen und die Immunantwort, z.B. die Produktion von Antikörpern und Botenstoffen, auslösen und auch regulieren, werden in den B-Zellen diese Antikörper gebildet.^[8, 9, 11]

3.1.1 Allgemeine Strukturen

Die verschiedensten existierenden Immunoglobuline der Säugetiere lassen sich in wenige Gruppen zusammenfassen, da sie sehr viele Gemeinsamkeiten aufweisen. Sie sind glykosylierte Proteine, die zu 82-96 % aus Aminosäuren und zu 4-18 % aus Kohlenhydraten bestehen.^[12] Alle Immunoglobuline haben eine gemeinsame Grundstruktur, sie bestehen aus vier Ketten und zwar aus zwei leichten Ketten und zwei schweren Ketten, die aus Aminosäuren aufgebaut sind. Diese Ketten sind durch intermolekulare Disulfidbrücken verbunden. Dabei ist jeweils eine leichte Kette an eine schwere gebunden und die beiden schweren Ketten sind in der Hinge-Region (Gelenkregion) miteinander verbunden. Darüber hinaus befinden sich innerhalb der verschiedenen Ketten noch intramolekulare Disulfidbrücken, welche durch die Bildung von Loops in den Aminosäureketten für die kompakte räumliche Struktur und die Bildung von Domänen verantwortlich sind.^[13] Als weitere primäre Struktur lassen sich in den unterschiedlichen Immunoglobulinen die konstanten und die variablen Domänen wiederfinden, wobei in der leichten Kette jeweils eine konstante und eine variable Domäne vorhanden ist, in der schweren Kette jeweils eine variable und drei bis vier konstante.^[14] Neben diesen Strukturen lassen sich weitere definieren, in die sich die einzelnen Immunoglobuline ebenfalls unterteilen lassen, dies sind das F_c-Fragment und die beiden identischen F_{ab}-Fragmente (Abbildung 1). Im F_{ab}-Fragment befinden sich in den leichten und schweren Ketten jeweils eine konstante und eine variable Domäne.^[15] Die variablen Domänen bilden über ihre Enden, die terminalen Aminogruppen, die Antigenbindungsstellen, die Paratope. Das F_c-Fragment besteht aus jeweils zwei bis drei konstanten Domänen je schwerer Kette und definiert den Isotyp und die Subklasse des Immunoglobulins.^[14] Darüber hinaus ist dieser Bereich für die Bindung an Rezeptoren oder auch an Makrophagen verantwortlich.^[15]

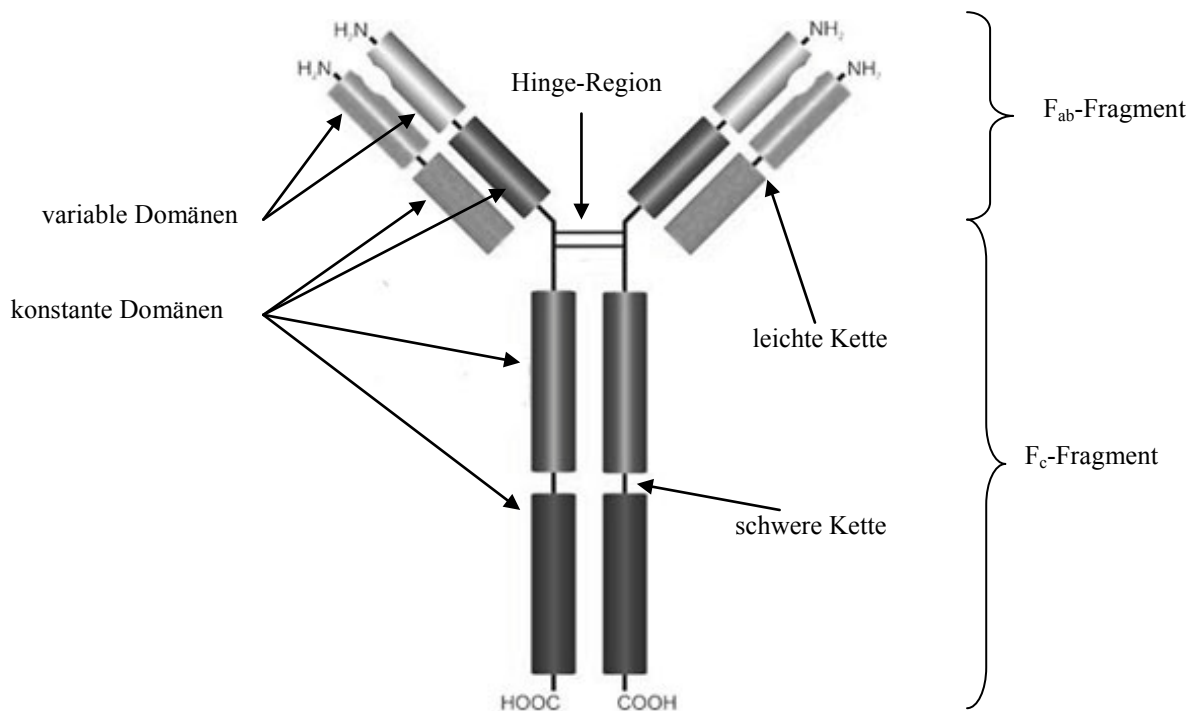


Abbildung 1: Allgemeine Struktur eines Antikörpers nach ^[14].

3.1.2 Immunoglobulinklassen

Die Immunoglobuline lassen sich in fünf Klassen zusammenfassen: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM.^[16] Neben den Immunoglobulinen, die bei Säugetieren vorkommen, existieren noch einige weitere Klassen von Immunoglobulinen, die allerdings nur bei einigen wenigen Tierarten vorkommen. Für alle diese Subtypen ist die Grundstruktur allerdings gleich, bestehend aus leichten und schweren Ketten, die über Disulfidbrücken aneinander gebunden sind. Unterschiede gibt es jedoch in der Anzahl der Domänen und der Disulfidbrücken. IgM Antikörper sind ein Komplex aus fünf, selten sechs Antikörpermolekülen, die über Disulfidbrücken aneinander gebunden sind.^[14] Die verschiedenen Antikörperklassen sind in Abbildung 2 dargestellt. Neben den Unterschieden in den Domänen und den Disulfidbrücken sind auch die verschiedenen Glykosylierungen gezeigt, die sich in der Anzahl und der Position deutlich in den Immunoglobulinklassen unterscheiden. Die verschiedenen Immunoglobulinklassen unterscheiden sich in ihrer Abundanz und in ihrer Halbwertszeit im Serum.^[14]

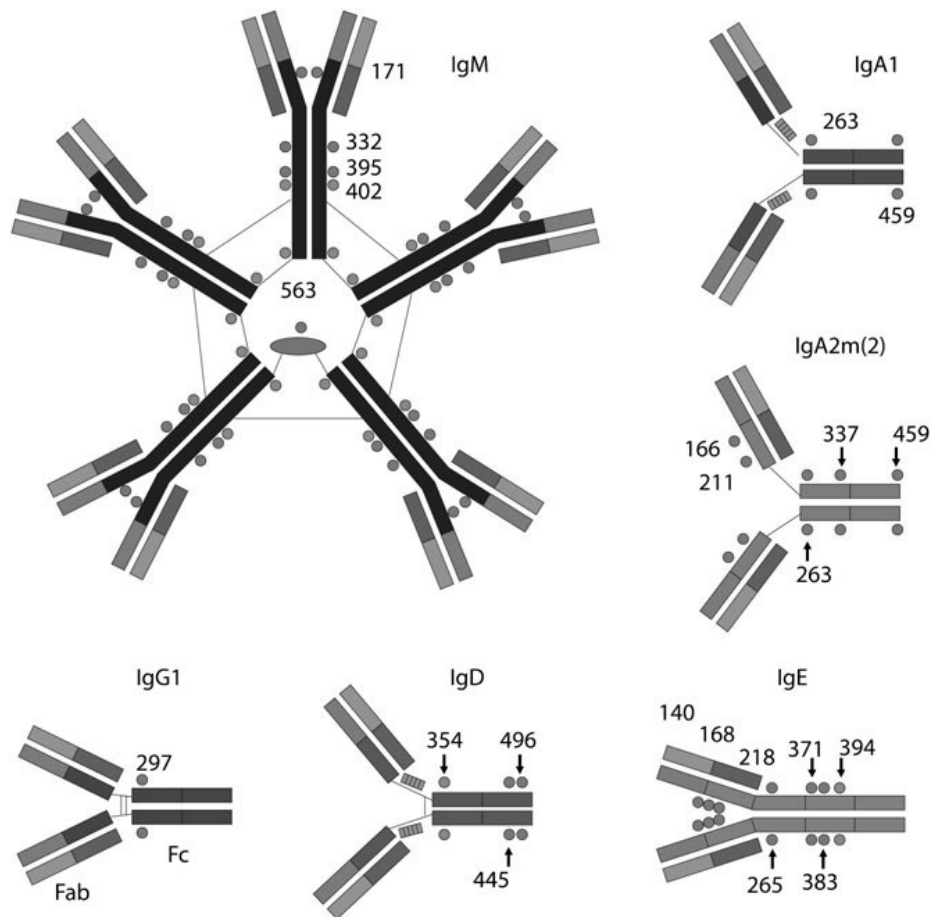


Abbildung 2: Strukturen der unterschiedlichen Immunoglobuline, mit den Unterschieden in den Glykosylierungen (Kreise) mit deren jeweiligen Positionen, an welchen sich diese Aminosäuren befinden^[14].

3.1.3 Immunoglobulin G

Im menschlichen Körper machen die Immunoglobuline des Isotyps IgG 75 % aller Immunoglobuline aus, diese haben auch die längste Halbwertszeit im Serum aller Immunoglobulinisotypen.^[14] Im Falle der IgGs existieren vier Subklassen (IgG1-IgG4).^[17] Die Subklassen haben eine Abundanz von IgG1 > IgG2 > IgG3 > IgG4.^[18] Dabei sind die Aminosäuresequenzen der konstanten Domänen zu 95 % identisch.^[15] Die größten Unterschiede in den Subklassen finden sich in der Hinge-Region (Gelenkregion) (Abbildung 3).^[19, 20] Unterschiede gibt es bei der Anzahl der Aminosäuren in der Hinge-Region und der Anzahl an Disulfidbrücken zwischen den schweren Ketten. In dieser Region sind die Immunoglobuline beweglich, diese Flexibilität unterscheidet sich in den Subklassen (IgG3 > IgG1 > IgG4 > IgG2).^[21, 22] Ein IgG1-Antikörper besitzt beispielsweise vier intermolekulare Disulfidbrücken, zwei zwischen den schweren und leichten Ketten, sowie zwei in der Hinge-Region. Außerdem gibt es zwölf intramolekulare Disulfidbrücken innerhalb der einzelnen Ketten. Dies ergibt insgesamt 16 Disulfidbrücken und damit 32 Cysteine.^[23, 24]

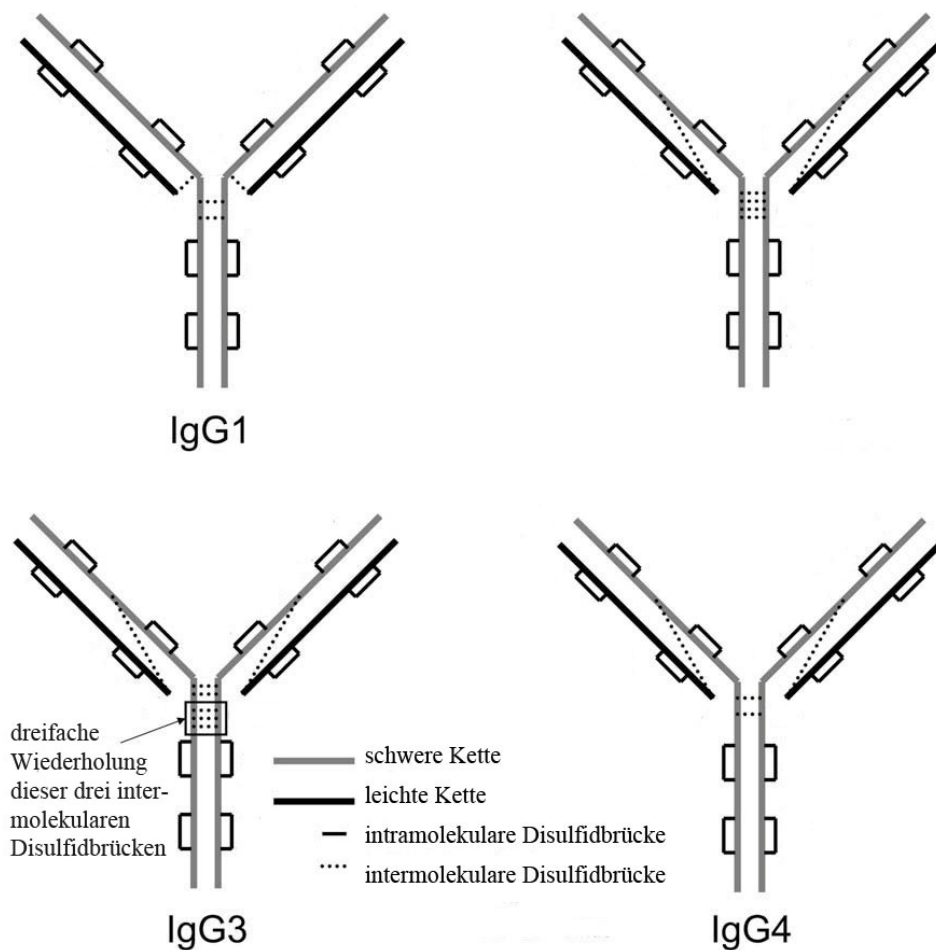


Abbildung 3: Strukturen der unterschiedlichen IgG Subklassen mit Darstellung der unterschiedlichen Anzahl an Disulfidbrücken^[25].

Alle IgGs sind im F_c -Fragment glykosyliert (Abbildung 4).^[26] Dies erfolgt immer an der gleichen Stelle der Aminosäure Asparagin: an der Position 297 (Asn 297).^[27] Allerdings ist es möglich, dass die beiden Asparagine in beiden Ketten unterschiedlich glykosyliert sind.^[26, 28] Die Glykosylierungen bestehen zum überwiegenden Teil aus *N*-Acetylglukosaminen (GlcNAc) und Mannosen (Man), sowie zu geringeren Anteilen aus *N*-Acetyl-Neuraminsäuren (Sialinsäure (Sia)), Galactosen (Gal), des *N*-Acetylglukosamins und Fucose (Fuc).^[29] Insgesamt 16 verschiedene Arten von neutralen Oligosacchariden wurden in humanen IgGs bisher identifiziert, was 136 theoretisch mögliche Glykosylierungsmuster ergibt.^[27, 30] Die Zuckerseite interagiert mit der hydrophoben Tasche der F_c -Domäne und stabilisiert so die Struktur der IgGs.^[31, 32] Eine weitere typische posttranslationale Modifikation^[33] bei IgGs ist die unterschiedliche Anzahl an Lysinen am C-Terminus des F_c -Fragments.^[29, 34, 35]

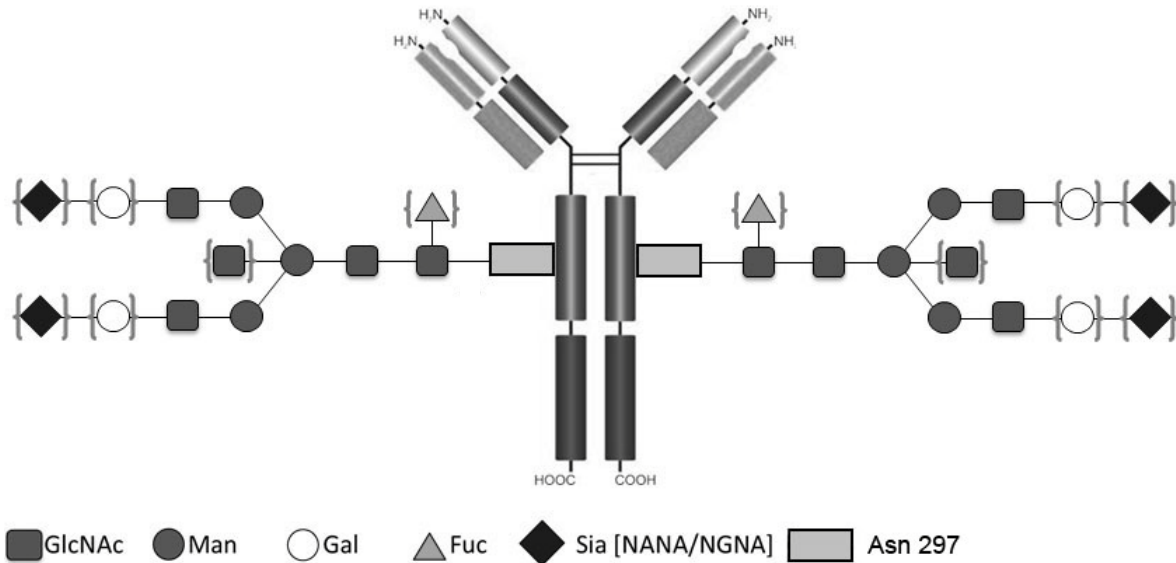


Abbildung 4: Struktur eines IgG 1-Antikörpers mit den unterschiedlich möglichen Glykosylierungsmustern nach^[36].

3.1.4 Eigenschaften von Immunoglobulinen

Die große strukturelle Ähnlichkeit von Immunoglobulinen führt oft zu vergleichbaren Eigenschaften. Ein Beispiel ist die gute Bindung an eine Reihe von Proteinen, im Speziellen die Proteine A, G und L.^[37-39] Diese Proteine aus verschiedenen Bakterien binden an sehr spezifische Stellen der Immunoglobuline (Abbildung 5)^[40] und dienen Bakterien als Schutz gegen die Immunantwort, indem sie die Immunoglobuline binden und diese somit nicht mehr zur Abwehr zu Verfügung stehen.^[41, 42] Aus diesem Grund lassen sich diese Proteine hervorragend zur Reinigung von Immunoglobulinen einsetzen, da die gebildeten Bindungen alle reversibel sind.^[40] Ein weiteres Bakterienprotein, welches ebenfalls an einige Immunoglobuline bindet, ist das Protein H.^[43, 44] Als ein Beispiel für die Bindung dieser Proteine soll dies am Protein A genauer dargestellt werden. Das Protein A stammt aus dem Bakterium *Staphylococcus aureus* und hat ein Molekulargewicht von 45 kDa. Es verfügt über fünf Domänen, die Immunoglobuline binden können.^[45] Dies geschieht über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und zwei Salzbrücken, an den Bindungen sind eine Vielzahl von Aminosäuren beteiligt, insgesamt sind es 32 Aminosäuren beim Protein A.^[46] Den Hauptteil des hydrophoben Effekts von Protein A bilden Phe-124, Phe-132, Tyr-133, Leu-136, Ile-150 und die Seitenkette von Lys-154. Das Phenylalanin-132 und das Tyrosin 133 bilden dabei den hydrophoben Kern. Auch an den Wasserstoffbrückenbindungen sind Phe-132 und Tyr-133 beteiligt und darüber hinaus auch Gln-128, Asn-130 und Asn-140. Lysin-154 und Arginin-146 bilden die Ionenpaarbrücken. Da

Protein A eine gute Bindung an viele Immunoglobuline aufweist, was an der Affinitätskonstante von $10^8 \text{ (M}^{-1}\text{)}$ zu sehen ist, wird es häufig als Chromatographiematerial eingesetzt.^[47, 48] Es gibt darüber hinaus viele Versuche, diese Bindungseigenschaften nachzustellen, um daraus einfachere und leichter einsetzbare Affinitätsmaterialien herzustellen.^[22, 46] Darüber hinaus gibt es auch Ansätze, die Stabilitäten der eingesetzten Proteine zu erhöhen, z.B. gegen die Konzentration von Alkalimetallen.^[45, 49]

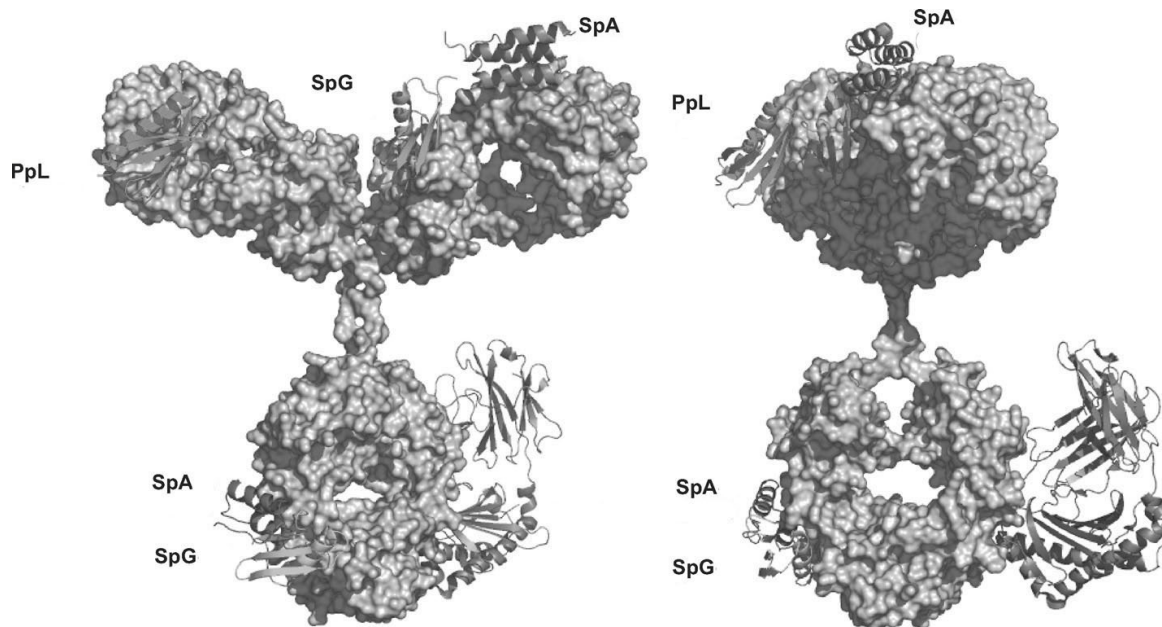


Abbildung 5: Struktur eines IgG 1 mit den Bindungsstellen von Protein A (SpA), Protein G (SpG) und Protein L (PpL)^[40].

3.1.5 Herstellung und Anwendungen von Antikörpern

Durch die große Zahl an natürlichen Immunoglobulinen und deren spezifische Antigene lassen sich sehr viele unterschiedliche Anwendungen ableiten. Zu der großen Zahl bereits vorhandener Immunoglobuline lässt sich durch biochemische Verfahren noch eine sehr große Menge neuer Immunoglobuline herstellen.^[50] Zum einen kann dies gentechnisch durch die Erzeugung von chimären Immunoglobulinen geschehen. Dabei ersetzt beispielsweise der F_c -Teil eines Maus-Immunoglobulins den eines humanen Immunoglobulins.^[51, 52] Eine andere Methode ist der Einsatz der Hybridom-Technik, bei der B-Zellen mit Krebszellen verschmolzen werden. Die eingesetzten B-Lymphozyten (weiße Blutkörperchen) entstammen vorher dafür immunisierten Lebewesen.^[53]

Beim Einsatz von Immunoglobulinen werden zwei Gruppen unterschieden: die polyklonalen und die monoklonalen Antikörper. Der Unterschied zwischen diesen Gruppen ist die

Bindungsspezifität. Während monoklonale Antikörper durch die Klonierung einzelner B-Zellen spezifisch an ein einzelnes Epitop des Antigens binden, sind polyklonale Antikörper eine Mischung verschiedener Antikörper. Diese Antikörper sind ebenfalls spezifisch für ein Antigen, sie binden allerdings an unterschiedliche Epitope des gleichen Antigens. Polyklonale Antikörper werden durch Aufreinigung aus Seren immunisierter Tiere, meistens Ziegen, Kaninchen, Mäuse oder Ratten, gewonnen.^[50, 54, 55]

Mit diesen Immunoglobulinen können verschiedenste Krankheiten behandelt werden. Dazu zählen beispielsweise Autoimmun-, Herz- und Infektionserkrankungen sowie Krebs.^[56] Die Möglichkeiten der Anwendung im medizinischen Bereich sind dabei sehr breit gefächert. Ein Beispiel ist die Gabe von Antikörpern, die an Rezeptoren binden und als Antagonisten wirken und somit die Abstoßung von transplantierten Nieren verhindern. Auch bei Morbus Crohn werden Antikörper eingesetzt, hierbei binden sie Signalproteine und wirken als Rezeptorantagonist.^[57-59] Als weiteres Beispiel können die Studien zur Immunotherapie bei Alzheimer genannt werden. In dieser werden in einer passiven Immunisierung durch die Gabe von Antikörpern die β -Amyloid-Plaques reduziert und somit können Erinnerungsdefizite aufgehoben werden.^[60] Immunoglobuline können auch Auskunft über den aktuellen Stand einer Erkrankung liefern, indem ihre aktuelle Zusammensetzung untersucht wird, wodurch Rückschlüsse auf den Verlauf der Erkrankung möglich werden. Ein Beispiel dafür ist die rheumatische Arthritis. Bei dieser Krankheit sind die verschiedenen IgGs überexprimiert und durch eine Analyse der Konzentrationen und Verhältnisse der Immunoglobuline lassen sich beispielsweise Aussagen über Entzündungen im menschlichen Körper treffen.^[61, 62]

Neben den Anwendungen als Medikament gibt es noch weitere Anwendungsbereiche für Antikörper. Dazu zählt der Einsatz als analytischer Marker wie beim *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA). Hier werden Komplexe aus Antikörper und Antigen gebildet und diese durch sekundäre Antikörper detektiert, welche wiederum durch Fluoreszenztags so modifiziert sind, dass eine photometrische Analyse möglich wird.^[63] Durch die hervorragenden spezifischen Bindungseigenschaften von Antikörpern können so Analyten sehr nachweisstark bestimmt werden. Auch in der Immunohistochemie werden Antikörper als Marker sehr intensiv eingesetzt.^[64, 65] Dafür werden die bindenden Antikörper vorher durch entsprechende Tags modifiziert. Bei den Tags kann es sich um unterschiedlichste Moleküle handeln, wie fluoreszierende Moleküle oder Metallkomplexe. Letztere können beispielsweise anschließend mittels induktiv gekoppelter Plasmamassenspektrometrie (ICP-MS) gemessen werden.^[66-68] Überwiegend handelt es sich bei diesen Metallkomplexen um Metallionen, die in einem ringförmigen Molekül der 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure

(DOTA) gebunden sind.^[69, 70] Der DOTA Ring wird für die Markierungsreaktionen mit einem Linker versehen, der eine funktionelle Gruppe trägt, mit der eine Bindung an das Zielmolekül erfolgen kann. Zwei der prominentesten Vertreter sind 2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure (*p*-SCN-Bn-DOTA) und 2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-propanamido)-benzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetrayl)-tetraessigsäure (MeCAT-Mal), ein Vertreter des *Metal-coded Affinity Tagging* (MeCAT).^[71, 72] Während *p*-SCN-Bn-DOTA mit freien Aminogruppen reagiert, haben die MeCAT-Reagenzien Thiolgruppen als Reaktionspartner.^[73] MeCAT umfasst verschiedene Reagenzien, die sich in der funktionellen Gruppe, die mit Thiolen reagiert, unterscheiden. Bei diesen funktionellen Gruppen handelt es sich um Maleinimid oder Iodacetamid.^[70] In Abbildung 6 ist als Beispiel die Struktur von *p*-SCN-Bn-DOTA gezeigt.

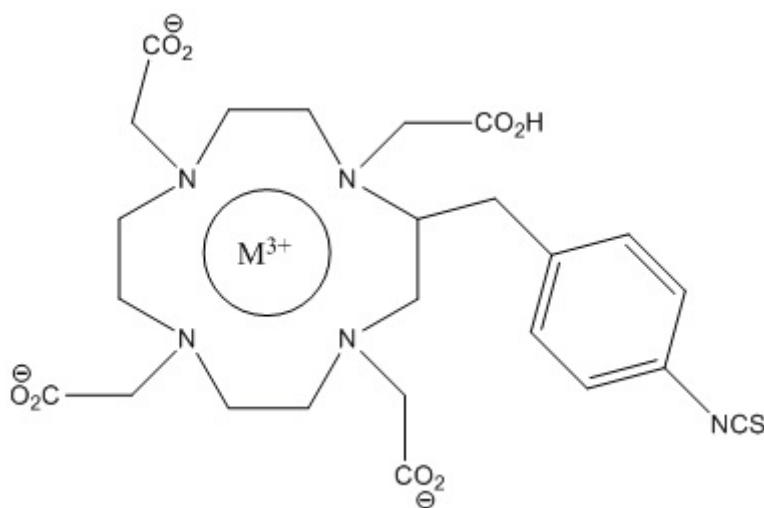


Abbildung 6: Struktur von *p*-SCN-Bn-DOTA, wobei das zentrale Metallion ein dreifach positives Lanthanoid ist.

Die erwähnten Markierungen beinhalten nur ein Metallion. Um die Nachweisgrenze verbessern zu können, bieten sich Markierungen mit mehreren Bindungsstellen für Metallionen an.^[74, 75] Bei diesen Materialien kann es sich um Polymere handeln, wobei diese teilweise auch aus DOTA bzw. DPTA (Diethylentriaminpentaessigsäure) Einheiten aufgebaut sein können. Neben den qualitativen Ergebnissen, die mit diesen Markierungen zugänglich sind, können die Markierungen auch zur quantitativen Analyse genutzt werden.^[68] Für diese Einsatzmöglichkeit ist es nötig, den Grad der Markierung genau zu bestimmen. Dafür wurde bisher ICP-MS verwendet, bei dem der Metallgehalt gegen Salzstandards gemessen wird.^[68, 76] Allerdings ist es mit dieser Methode nur möglich, einen Summenparameter zu bestimmen. Über den Grad der Markierung der einzelnen Antikörper kann keine Aussage getroffen

werden. Darüber hinaus muss dafür die Konzentration des Antikörpers bekannt sein, was auch nicht immer der Fall ist.

Für das Markierungsreagenz *p*-SCN-Bn-DOTA(Ho) sind aus der Literatur Markierungsgrade für verschiedene Proteine bekannt, wobei sich diese Markierungsgrade auf die Anzahl an Markierungen pro Proteinmolekül beziehen, nicht auf die Anzahl an verfügbaren Lysinen oder endständiger freier Amine. Zur Bestimmung der Markierungsgrade wurden Laser Ablation-ICP-MS-Messungen (LA-ICP-MS) von Western-Blot-Membranen durchgeführt und ins Verhältnis zur Antikörperkonzentration gesetzt, welche durch einen Bradford-Assay bestimmt wurde.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit für Antikörper ist die Affinitätschromatographie.^[77] Durch die sehr guten Bindungseigenschaften von Antikörpern können spezifisch die entsprechenden Antigene gebunden und später eluiert und somit aufgereinigt werden.

3.2 Eingesetzter Antikörper

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Antikörper als Modellsystem eingesetzt: der humane IgG1-Antikörper gegen das Protein Interleukin-8. Dieser monoklonale Antikörper wird in Säugetierzellkulturen nach der Hybridom-Technik hergestellt.^[53]

3.2.1 Interleukin-8 (IL-8)

Interleukin-8 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 8,4 kDa und gehört in die Klasse der CXC-Motiv-Chemokine. CXC-Chemokine beginnen in ihrer Aminosäuresequenz N-terminal mit zwei Cysteinen, die jedoch im Unterschied zu anderen Chemokinklassen durch eine andere Aminosäure voneinander getrennt sind.^[78] IL-8 ist ein Zytokin und fungiert als Entzündungsmediator und als Angiogenesefaktor.^[79] Dabei wirkt Interleukin-8 als starker chemischer Botenstoff.^[80] Es ist ein starker Aktivator für Neutrophile (Granulozyten)^[81] und verantwortlich für etwa 70 % der chemotaktischen Aktivität von Neutrophilen in Lungenflüssigkeit von Patienten mit hypoxämischem Atmungsversagen.^[80] Auch in der Pathogenese von rheumatischer Arthritis^[82], Sepsis^[83] und Schuppenflechte^[84] spielt Interleukin-8 eine Rolle.

3.2.2 Anti-Interleukin-8 (Anti-IL-8)-Antikörper

Der Antikörper Anti-Interleukin-8 ist ein humaner IgG1-Antikörper. Die Affinität von Anti-IL-8 zum Antigen Interleukin-8 liegt bei $\sim 10^{-12}$ mol/L.^[85] Durch die Bindung des IL-8 an den Antikörper kommt es zu einer geringeren Aktivität des IL-8 und somit sinkt die chemotaktische Aktivität und auch die Aktivierung der Neutrophile wird verhindert.^[85] Neben den Wirkungen des IL-8 selber weist der Komplex aus Anti-IL-8 und IL-8 (Anti-IL-8:IL-8) gewisse Reaktivitäten auf. Es zeigt sich auch, dass der Komplex sich in den Lungen von Patienten mit akutem progressivem Lungenversagen ablagert.^[86, 87] Eine erhöhte Konzentration des Anti-IL-8:IL-8 Komplexes lässt sich mit der klinischen Schwere von rheumatischer Arthritis in Verbindung bringen.^[88]

3.3 Antikörperanalyse

Da es sich bei Antikörpern um relativ große Proteine handelt, stellt dies spezielle Anforderungen an die Analysemethoden.

Eine standardmäßig eingesetzte Technik zur Analyse von Proteinen ist die Kristallstrukturanalyse. Dazu werden die Proteine kristallisiert und anschließend mit Röntgenstrahlung bestrahlt, die dabei entstehenden Beugungsmuster werden bestimmt. Aus diesen Mustern können die Proteinstrukturen errechnet werden.^[89] Das Problem dabei ist, dass Antikörper als Ganzes sich nur sehr schwer kristallisieren lassen, während der F_c-Teil sich sehr gut kristallisieren und anschließend analysieren lässt.^[26, 90] Aus dieser Eigenschaft leitet sich auch die Bezeichnung F_c-Teil ab (*fragment crystallizable region*).^[91] Der F_{ab}-Teil (*fragment antigen binding*) dagegen lässt sich nur selten kristallisieren.^[91] Aus diesem Grunde ist auch der komplette Antikörper schwierig kristallisierbar.^[92-94] Die verschiedenen Modifikationen erhöhen die Schwierigkeiten noch weiter. Des Weiteren ist die Kristallisation ein sehr zeitaufwändiger Prozess und somit für Routinemessungen nicht geeignet.

Weitere Analyseverfahren wie beispielsweise die Gelelektrophorese liefern in gewissen Grenzen Informationen über die Größe von Molekülen, wobei allerdings keine Aussagen über die räumliche Struktur getroffen und auch Bindungsverhältnisse nur sehr bedingt wieder gegeben werden können.^[95, 96] Kleine Massenunterschiede können mit Hilfe der Gelelektrophorese nicht erkannt werden. Die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR, Nuclear Magnetic

Resonance) bietet den Zugang zu räumlichen Information, allerdings sind die Spektren sehr komplex und es kommt zu Signalüberlagerungen aufgrund der Größe des Antikörpers und der damit verbundenen hohen Anzahl an Signalen. Darüber hinaus benötigt man auch verhältnismäßig große Probenmengen, um Messungen überhaupt durchführen zu können, beispielsweise 2 mL einer Antikörperlösung mit einer Konzentration von 0,4 mmol/L.^[97, 98]

Eine sehr weit verbreitete Methode zur Analyse von Antikörpern ist die Massenspektrometrie (MS). Bei dieser werden Ionen nach ihren Masse-zu-Ladungsverhältnissen untersucht. Zur Analyse werden oft MALDI-ToF-MS eingesetzt, da diese die Messungen von großen Molekülen erlauben.^[99] Der Nachteil dabei ist oft die geringe Auflösung im oberen m/z -Bereich, doch gerade dieser m/z -Bereich ist für die Antikörperanalytik notwendig.^[100] Um dies zu umgehen, wird beispielsweise versucht, mit ESI-MS Geräten zu arbeiten. Dazu werden wie in der Proteinanalytik häufig Ameisensäure (AA) oder Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt, um mehr Ladungen zu erzeugen. Damit werden die Analyten für Analysatoren zugänglich, die in kleineren Massenbereichen arbeiten und oft bessere Auflösungen bieten, als ToF-Geräte in hohen m/z -Bereichen.^[101] Die stark sauren pH-Werte der organischen Säuren führen häufig zur Entfaltung von Proteinen und somit zum Verlust von strukturellen Informationen und eventuell auch zum Verlust von Bindungseigenschaften durch die Entfaltung.^[102, 103] Es kommt zu einer Denaturierung der Proteine.^[104] Durch Entfaltungen bieten sich mehr funktionelle Gruppen an, die Ladungen tragen können, als dies bei nativen Proteinen der Fall ist.^[105] Allgemein kann gesagt werden, dass der pH-Wert und damit auch die Anzahl der Ladungen eine wichtige Größe für die Entfaltung eines Proteins ist.^[106] Während niedrige Ladungszustände durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen im Molekül zu globulären Strukturen führen, entstehen durch hohe Ladungszustände abstoßende Coulombkräfte zwischen den geladenen Seitenketten, was zu offenen und gestreckten Strukturen führt.^[107] Um dieses zu verhindern, können Puffersysteme eingesetzt werden, wie z.B. Ammoniumacetat. Durch dieses wird der Analyt während der Ionisation deutlich weniger geladen und bleibt somit intakt und native. Allerdings führt dies erneut zu den bereits beschriebenen Problemen der Detektion, sowie zu Problemen der Stabilität dieser Ionen. In den letzten Jahren gab es jedoch verschiedenste instrumentelle Entwicklungen, sodass die Messung kompletter Antikörper mittels ESI-MS möglich wird.^[108-110] Viele Analysen werden allerdings weiterhin mit Teilen von Antikörpern durchgeführt, da dies die instrumentellen Anforderungen reduziert. Die besondere Struktur von Antikörpern erfordert Analysen, die in der üblichen Protein- und Peptidanalytik nicht notwendig sind. Durch die

Kettenstruktur lässt sich der Antikörper mittels Reduktionen der Disulfidbrücken in die einzelnen Ketten spalten.^[111] Es ist darüber hinaus auch möglich, durch partielle Reduktionen die Ketten selektiv zu spalten. Die unterschiedlichen möglichen Produkte dieser Reduktionen sind in Abbildung 7 dargestellt.

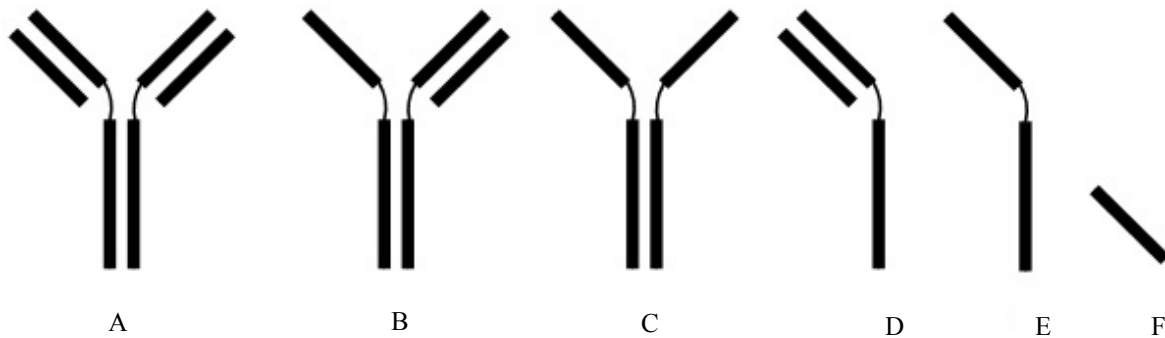


Abbildung 7: Schematische Darstellung aller möglichen Reduktionsprodukte eines IgG Antikörpers, die durch die Reduktion der intra- und intermolekularen Disulfidbrücken entstehen können. Durch partielle Reduktion können ausgehend vom kompletten Antikörper (A) über die Zwischenstufen (B-D) die einzelnen Ketten (E, F) erhalten werden^[112].

Eine weitere Methode, um Antikörper sehr selektiv in kleinere Untereinheiten zu zerlegen, ist der Einsatz von Proteasen. Hierbei sind vor allem Papain und Pepsin zu nennen. Pepsin ist eine Aspartatprotease, die bei der Proteolyse der meisten Proteine die Peptidbindungen der Aminosäuren Phenylalanin, Leucin, Methionin und Tryptophan hauptsächlich C-terminal hydrolysiert.^[113, 114] Auf Grund der Häufigkeit dieser Aminosäuren sind die resultierenden Peptide oft relativ klein. Im Falle der Immunoglobuline spaltet Pepsin die Aminosäureketten unterhalb der Hinge-Region im F_c -Fragment. Das nun freie F_c -Fragment wird weiter hydrolysiert und damit in kleine Peptide zerlegt, das $F_{(ab)2}$ -Fragment bleibt allerdings erhalten und ist auch weiterhin aktiv (Abbildung 8).^[115, 116] Papain ist eine Cysteinprotease und hydrolysiert die Bindung hinter Arginin, Lysin, Glutaminsäure, Histidin, Glycin und Tyrosin.^[114] Im Falle der Immunoglobuline kommt es ebenso wie im Falle des Pepsins nicht zu einer umfassenden Hydrolyse der Aminosäureketten und somit zur Bildung vieler kleiner Peptide. Es entstehen je nach Reaktionsführung das F_c -Fragment und entweder das $F_{(ab)2}$ -Fragment oder die beiden F_{ab} - Fragmente (Abbildung 8). Der Unterschied ist das eventuelle Vorhandensein von freiem Cystein in der Reaktionsmischung während der Proteolyse.^[117, 118]

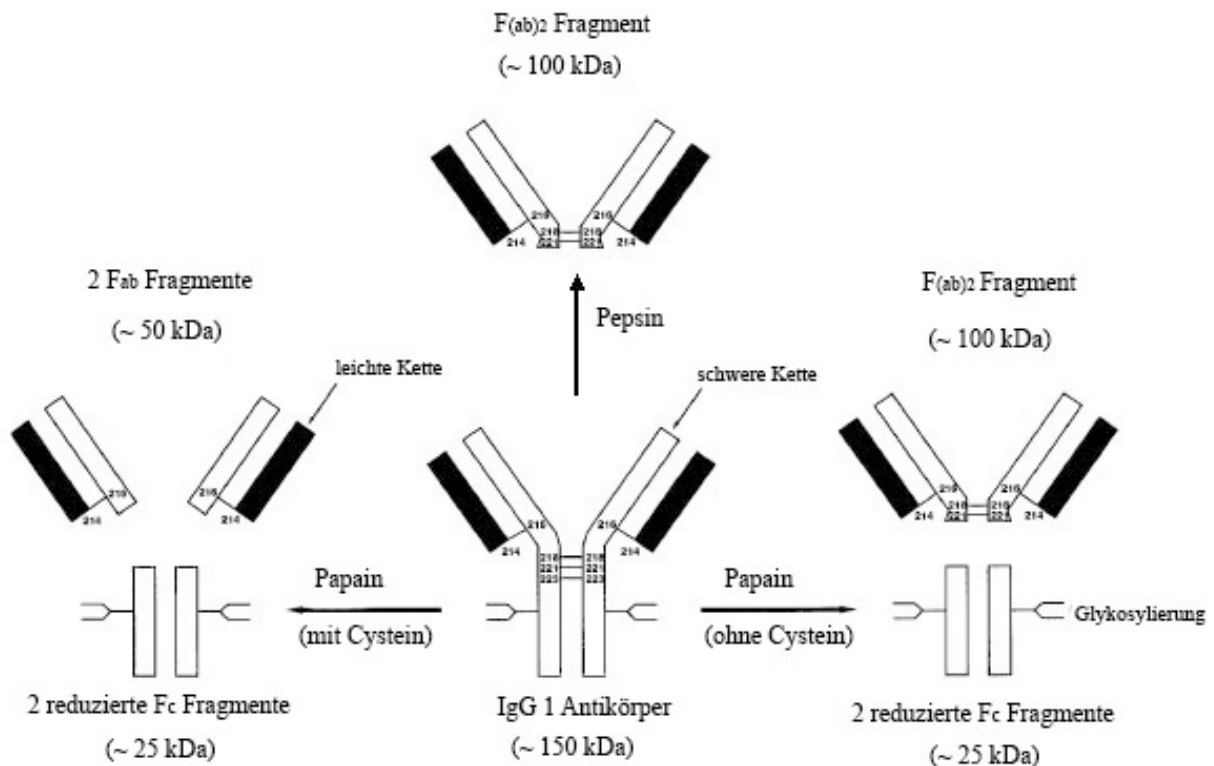


Abbildung 8: Proteolysen eines IgG mit Papain bzw. Pepsin, abgeändert nach^[118].

Die Vorteile dieser Proteolysen sind die Erhaltung der Fragmente des Antikörpers, die auch weiterhin Antigene binden können. Diese Aktivitätserhaltung ist ein klarer Vorteil gegenüber der klassischen Proteolyse mit Trypsin.^[119] Pepsin und Papain erzeugen Peptide, die sich zur weiteren Analyse hervorragend eignen. Dies ist zur Identifizierung des analysierten Immunoglobulins sehr wichtig. Durch die Kombination von Reduktion und eventuell einer Proteolyse mittels Pepsin oder Papain kann die Menge an entstehenden Peptiden stark reduziert werden, sodass Identifizierungen vereinfacht werden können.^[120]

Durch chemische Modifikationen lassen sich ebenfalls Informationen gewinnen. Ein Beispiel dafür ist die Modifikation mit Iod.^[121, 122] Bei dieser Modifikation wird die Aminosäure Tyrosin zweifach iodiert. Je nach Art der Reaktionsführung lässt sich auch Histidin zweifach iodieren (Abbildung 9). Mit dieser Art der Modifizierung kann somit die Anzahl der Tyrosine und der Histidine bestimmt werden. Da sowohl Tyrosin als auch Histidin in der Bindung zwischen Protein A und IgG Antikörpern eine Rolle spielen, bieten sich somit Ansätze zur Untersuchung dieser Bindung.^[46]

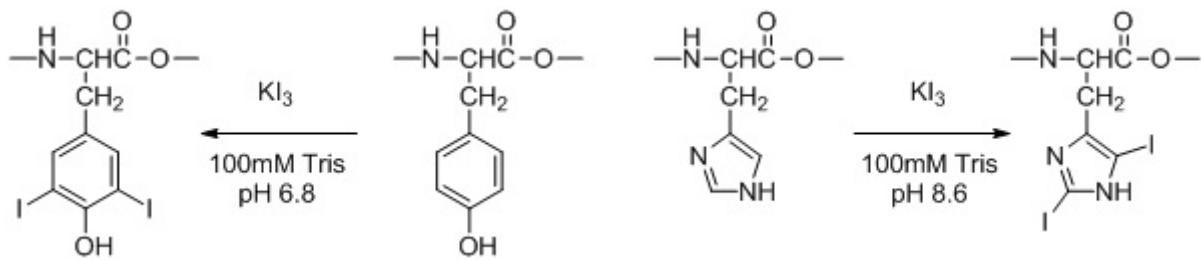


Abbildung 9: Iodierung von Tyrosin und Histidin mittels KI₃.

Mit Hilfe dieser sehr unterschiedlichen Verfahren soll der Anti-Interleukin-8 Antikörper analysiert und charakterisiert werden. Diese Kenntnisse dienen dazu, um in den sich anschließenden Schritten die Bindung des Antikörpers an Protein A oder Protein A ähnlichen Materialien untersuchen zu können, wofür auch die Charakteristika der einzelnen Fragmente und Ketten interessant sind.

3.4 Antikörperquantifizierung

Da Antikörper oft als Medikamente zum Einsatz kommen, ist eine verlässliche Quantifizierung von immenser Wichtigkeit, um beispielsweise Überdosierungen zu verhindern. Die aktuellen Verfahren zur Quantifizierung von Proteinen setzen oft auf die photometrische Messung von farbigen Komplexen. Bekannte Beispiele dafür sind der Biuret Test,^[123] der spezifischere und empfindlichere Lowry Test^[124, 125] und der BCA Test.^[126] Die in der Proteinanalytik am häufigsten eingesetzte Methode zur Konzentrationsbestimmung ist der Bradford Test. Dies ist ebenso wie die vorher genannten Tests ein photometrischer Assay, bei dem Proteine mit Coomassie Blue, einem Farbstoff, reagieren.^[127, 128] Die Absorption dieser blau gefärbten Komplexe wird mittels eines UV-Spektrometers gemessen. Als Referenzsubstanz dient in allen genannten Methoden Rinderserumalbumin (BSA, Bovine Serum Albumin). Dies kann allerdings problematisch sein, da BSA mit seiner Masse von 66 kDa im Vergleich zu IgGs mit etwa 150 kDa viel kleiner ist und auch die räumlichen Konfigurationen unterschiedlich sind. Beide Unterschiede können dazu führen, dass durch Messungen mit BSA falsche Werte erhalten werden.^[129] Andere Verfahren zur Quantifizierung nutzen sekundäre Antikörper, die über eine Biokonjugation mit einer fluoreszierenden, chemilumineszierenden oder farbigen Gruppe modifiziert sind und somit gemessen werden können.^[130] Auch chromatographische Methoden mit Protein A Säulen

werden eingesetzt. Hierbei werden die UV Signale des Antikörpers gemessen.^[131] Als Standard wird hier ebenfalls BSA eingesetzt. Alle verwendeten Methoden sind bisher nicht auf SI Einheiten zurückführbar. Dafür wären primäre Standards notwendig.

Um den Zugang zu solch einem primären Standard zu bekommen, kann das Heteroelement Schwefel genutzt und mittels ICP-MS gemessen werden. Schwefel ist in zwei Aminosäuren, dem Cystein und dem Methionin, enthalten und ist damit ubiquitär in allen Proteinen und vielen Peptiden vorhanden.^[132] Beide Aminosäuren haben zusammen eine Häufigkeit von etwa 5 % in natürlichen Proteinen.^[133] Wenn die Zahl der Cysteine und Methionine in einem Peptid oder einem Protein bekannt ist, dann kann aus einer Schwefelmessung mittels ICP-MS die Peptid- oder Proteinmenge quantifiziert werden.^[134, 135]

3.5 Aufreinigungstechniken

Zur Aufreinigung von Antikörpern gibt es verschiedenste Ansätze. Diese sind sehr stark von der Zielstellung abhängig. Einige Aufreinigungs- bzw. Trenntechniken sind gut für den Einsatz im Labor geeignet, während andere sich auch hervorragend für die Anwendungen in der Industrie eignen.

Ein Beispiel für die industrielle Anwendung ist der *Downstream process*, der Teil der Herstellung von Antikörpern ist. Nach der Herstellung in Zellkulturen werden verschiedene chromatographische Schritte durchlaufen, in denen die Antikörper aufgereinigt werden.^[136, 137] In zwei Drittel aller Fälle werden nach der Zentrifugation und Abfiltration der Zellbestandteile Protein A-Säulen zur Aufreinigung eingesetzt.^[138] Die außerordentlich guten Bindungseigenschaften von Protein A an Antikörper wurden bereits in Kapitel 3.1.4 beschrieben. Bis zu 50 % der Kosten im *Downstream process* entstehen durch den Einsatz der Protein A-Säulen.^[139] Der Grund liegt zum Großteil in der relativ kurzen Lebensdauer der Säulen, da diese nach 200-300 Zyklen ausgetauscht werden müssen, weil das Protein A durch notwendige Elutionsbedingungen degeneriert.^[140, 141] Dagegen überstehen beispielsweise Säulen für Gelfiltration, Ionenaustausch und Materialien für hydrophobe Wechselwirkungen bis zu 1000 Zyklen.^[142-144] Nach der Protein A-Säule kommt häufig eine Ionenaustauschersäule als letzte Stufe zur Aufreinigung zum Einsatz, um alle verbliebenen Verunreinigungen zu entfernen.^[145] Bei diesen handelt es sich überwiegend um niedermolekulare Verbindungen. Es können DNA-Fragmente, Verunreinigungen aus der Zellkultur,

denaturierte Verbindungen oder auch Protein A Moleküle sein, die von der Protein A Säule ausgewaschen werden. Dabei beruht die Aufreinigung mit Anionenaustauschersäulen auf der starken Bindung des Antikörpers an das Trennmateriel, da dieser deutlich basischer ist als die Verunreinigungen.^[139] Im Falle der Kationenaustauschersäulen kommt es auch zu einer starken Bindung an das Trennmateriel, allerdings besteht die Reinigung nicht im Durchfluss wie bei den Anionenaustauschersäulen, sondern aus einem Bindungsschritt des Antikörpers und einem anschließenden Elutionsschritt.^[137]

Neben den Protein A und Ionenaustauschersäulen stehen auch noch weitere Säulenmaterialien zur Verfügung.^[146, 147] Monolithische Säulen bieten sich beispielsweise an, da es bei diesen einfache Möglichkeiten gibt, die Oberflächen zu verändern und somit poröse Materialien mit hohen Bindungskapazitäten zu schaffen, Beispiele dafür sind Anionen- bzw. Kationenaustauschersäulen.^[148, 149] Die Größenausschlusschromatographie (SEC Size Exclusion Chromatography) ist ein Beispiel für Methoden, die eher im Labormaßstab für Trennungen geeignet sind. Bei der Trennung von Antikörpern von anderen Proteinen oder Antikörperoligomeren funktionieren diese gut, allerdings sind die Flussraten relativ gering und die Materialien druckempfindlich, was Anwendungen in größeren Maßstäben ausschließt.^[150] Ein weiteres Beispiel für andere Säulenmaterialien wären auch hydrophobe Mixmode-Materialien, die eine Kombination aus kationischen und hydrophoben Liganden darstellen.^[151] Ausgehend von diesen speziellen Materialien gibt es Versuche, die Kapazitäten und Spezifitäten von Protein A zu erreichen oder sogar zu übertreffen.^[152] Dies ist gerade im Hintergrund der hohen Kosten der Protein A Aufreinigung ein wichtiges Ziel. Neue Materialien müssen diese Wechselwirkungen möglichst vollständig oder zumindest möglichst viele dieser Effekte nachbilden. Durch die Entwicklung neuer Materialien bieten sich auch Chancen, weitere günstige Eigenschaften zu implementieren, über die Protein A basierte Techniken bisher nicht verfügten. Es ist beispielsweise vorteilhaft, die Stabilität gegenüber Einflussfaktoren wie die Alkalimetallkonzentration zu erhöhen, welche oft Teil von Elutionslösungen sind.^[49] Um diese Anforderungen zu erfüllen, werden unter anderem Peptide mit einer hohen Affinität zu Antikörpern untersucht.^[153-155] Neben natürlichen Peptiden werden auch synthetische Peptide für diese Zwecke eingesetzt.^[156, 157] Außer den erwähnten Ansätzen werden aktuell auch Polymermaterialien für diese Anwendungen entwickelt und untersucht.

3.5.1 Polymerbasierte Trennmaterialien

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren Teil des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Projektes „Antikörper-Selektive Materialien zum Downstream Processing (AbCAP)“.

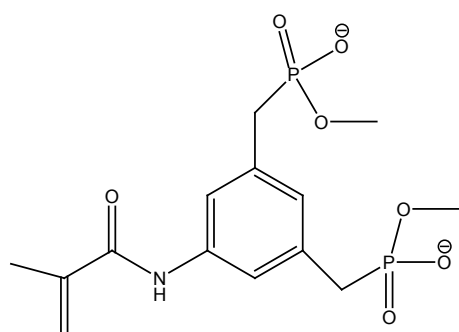
Ein wichtiger Teil des gesamten *AbCAP*-Projektes befasst sich mit der Synthese von neuen Polymeren, die eine gute Affinität zu Immunoglobulinen aufweisen sollen, um schlussendlich als neue Trennmaterialien eingesetzt werden zu können. In diesem Zusammenhang gibt es unterschiedliche Ansätze. Die beiden in diesem Projekt untersuchten Methoden hatten unterschiedliche Bereiche des Antikörpers zur Bindung im Blick. Der eine Ansatz befasste sich mit Polymeren, die die Bindung des Protein A an den Antikörper nachstellen sollen. Im anderen Ansatz war es das Ziel, ein Polymer zu entwickeln, das an den C-Terminus des F_c-Teils bindet. Da dieser Bereich sehr konstant in den einzelnen IgG Klassen ist, wäre es somit möglich, viele Antikörper mit solch einem Polymer zu binden.

Protein A mimetische Polymere

Eine erste Möglichkeit zur Bindung von Antikörpern ist die Nachbildung der Bindungsstelle des Protein A. Dabei soll nicht die komplette Aminosäuresequenz nachgebildet werden, sondern das Ziel ist es, Funktionalitäten, die in dieser Region liegen, nachzubilden. Durch die Verwendung von modifizierten Aminosäuren oder anderen kleineren Molekülen, die die entsprechenden Funktionalitäten aufweisen, können durch Polymerisation Materialien entstehen, die eine hohe Affinität zu Antikörpern aufweisen.^[158]

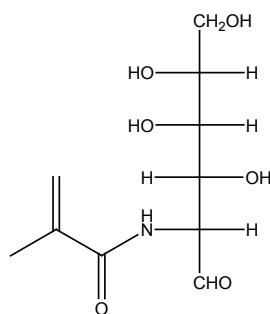
Die Polymere für diese Arbeiten wurden in der Gruppe von Prof. Thomas Schrader (Universität Duisburg-Essen) synthetisiert. Ein Beispiel für die unterschiedlichen Monomere ist das Polymer 6 der Gruppe von Prof. Schrader (Abbildung 10). Diese Monomere bilden ganz unterschiedliche Eigenschaften der verschiedenen bei der Protein A Bindung aktiven Aminosäuren nach, wie sie in Kapitel 3.1.4 beschrieben wurden. Es besteht aus drei A Monomeren, je einem Zucker, einem B Monomer und einem C Monomer sowie statistisch 0,5 Dansyl Monomeren, dafür werden alle Monomere in einer Eintopfpolymerisation statistisch miteinander polymerisiert.^[159] Das Monomer A bildet die Aminosäuren Lysin und Arginin nach, das Monomer C hat ähnliche anionische Eigenschaften wie Histidin. Ein Dansyl-Monomer weist ähnliche Bindungseigenschaften wie die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan auf und das B-Monomer bildet die Eigenschaften von aromatischen Aminosäuren nach. Durch die Kombination dieser unterschiedlichen Monomere sollte somit

eine Vielzahl an verschiedenen Bindungen nachgestellt werden können. Durch die Gel-Permeations-Chromatographie (GPC) Messungen in der Gruppe von Prof. Schrader wurde ein Molekulargewicht von 85 kDa für dieses Polymer ermittelt.



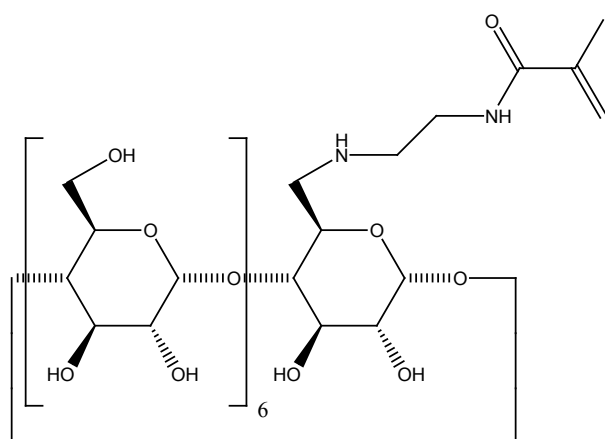
A Monomer

375,06 g/mol



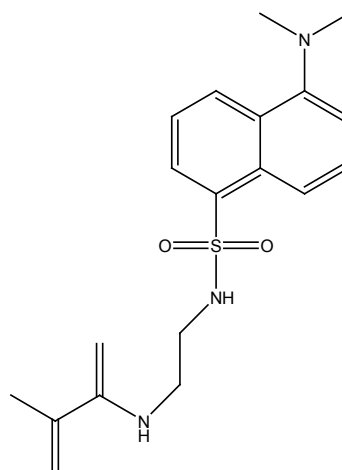
Zucker-Monomer

247,11 g/mol



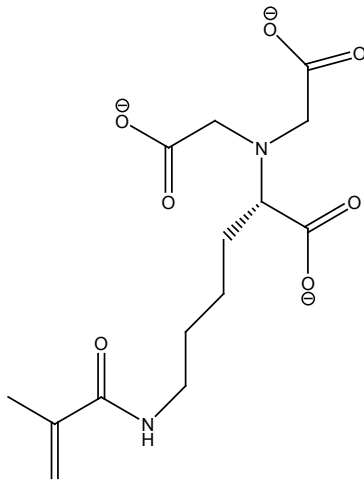
B-Monomer

1300,51 g/mol



Dansyl-Monomer

359,17 g/mol



C-Monomer

327,12 g/mol

Abbildung 10: Strukturen der Monomere des Polymers 6.

Als ein weiteres Beispiel für solche Strukturen ist das komplexere KYTR-Monomer mit einer Masse von 678 g/mol zu nennen, ebenfalls aus der Gruppe von Prof. Schrader (Abbildung 11). Dieses Tetrapeptid wurde über eine Festphasensynthese hergestellt und besteht aus den Aminosäuren Lysin, Tyrosin, Threonin und Arginin.^[22] Bis auf das Threonin sind diese Aminosäuren, wie bereits beschrieben, alle an der Bindung zum Protein A beteiligt, weshalb diese für diesen Polymerbaustein gewählt wurden.

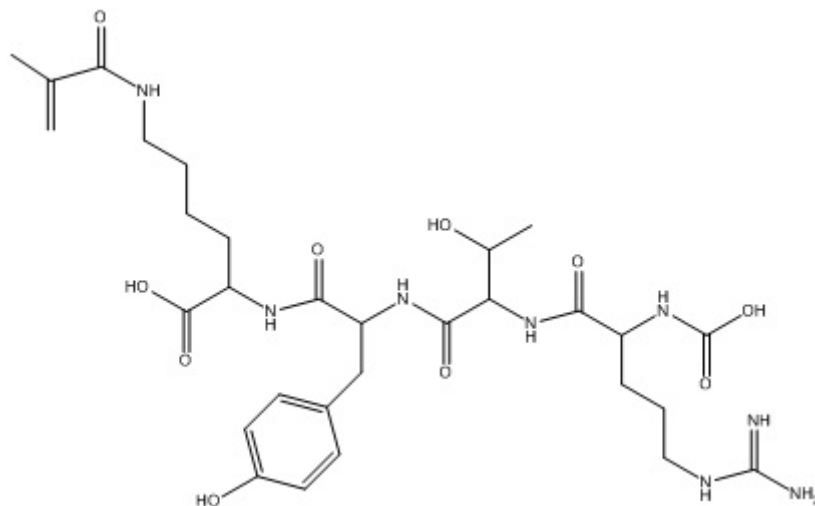


Abbildung 11: Struktur des KYTR-Monomers.

Als drittes Beispiel für diese Polymere soll das Polymer 10.1 erwähnt werden (Abbildung 12). Dieses Polymer wurde im Laufe der Arbeiten der Gruppe um Prof. Schrader als am besten bindendes Polymer ermittelt. Auch in diesem Fall werden verschiedenste Bindungseigenschaften der natürlichen Aminosäuren nachgebildet (Dansyl-Monomer = Phe, Tyr, Trp; A-Monomer = Lys, Arg; B-Monomer = aromatische Aminosäuren). Zur Ermittlung dieser Bindungseigenschaften wurde für dieses und die anderen Polymere und auch die Monomere ein ELISA Nachweis eingesetzt. In diesem wurde die Konkurrenz in der Affinität zwischen dem jeweils eingesetzten Polymer und Protein A in der Bindung zum Antikörper ausgenutzt.^[160]

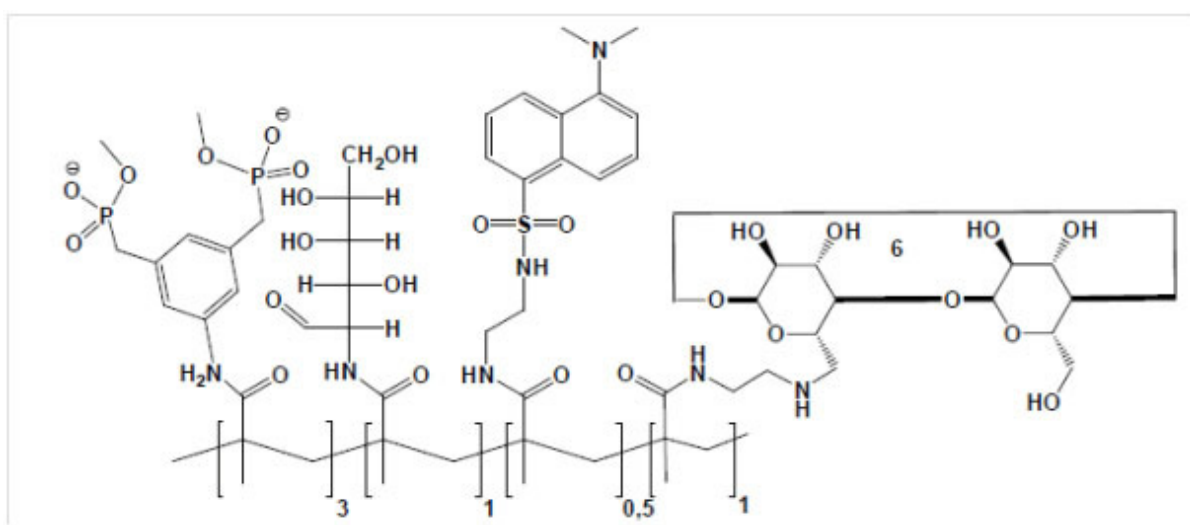


Abbildung 12: Struktur des Polymers 10.1.

Die Polymere, die in der Gruppe von Prof. Schrader hergestellt wurden, sind wasserlöslich. Dies ist für die nachfolgenden Analysen förderlich, da es die Untersuchungen erleichtern kann (siehe Kapitel 5.2.1).

Für den Einsatz als Trennmaterial ist dies allerdings nicht sinnvoll, weshalb die Polymere an ein festes Substratmaterial auf einer Oberfläche gebunden sein müssen. Da in vielen Fällen eine Adsorption zwar sehr intensiv sein kann, dies jedoch reversibel ist, müssen Polymere kovalent an die gewünschte Oberfläche gebunden werden. Diese Oberflächen können beispielsweise poröse Materialien sein, wie Polymerkügelchen, oder auch monolithische Materialien, was für die Anwendung als Chromatographiematerial sehr vorteilhaft wäre.^[161]

^[162] Eine weitere mögliche Oberfläche sind Membranen, die beispielsweise aus Zellulose bestehen. Diese haben den Vorteil, in Filtersysteme eingesetzt werden zu können. Sie sind sehr stabil, unter vielen Bedingungen einsetzbar und leicht in bestehende Prozesse

integrierbar. Darüber hinaus ist es bei Membranen sehr einfach, diese in ihrer Größe je nach Anwendung zu gestalten.^[163] In vielen Fällen passiert die Anbindung an die Oberfläche über photochemische Prozesse (Abbildung 13). Dabei bindet die aktive Gruppe über eine photochemische Reaktion an die Oberfläche und anschließend werden über andere funktionelle Gruppen die Polymere gebunden.^[164] Im Rahmen des *AbCAP*-Projektes wurden Versuche mit der Anbindung von Polymeren der Gruppe von Prof. Schrader an regenerierte Zellulosemembranen durch die Gruppe von Prof. Mathias Ulbricht (Universität Duisburg-Essen) durchgeführt. Die Untersuchungen zu den membrangebundenen Polymeren folgen im Kapitel 5.2.1.

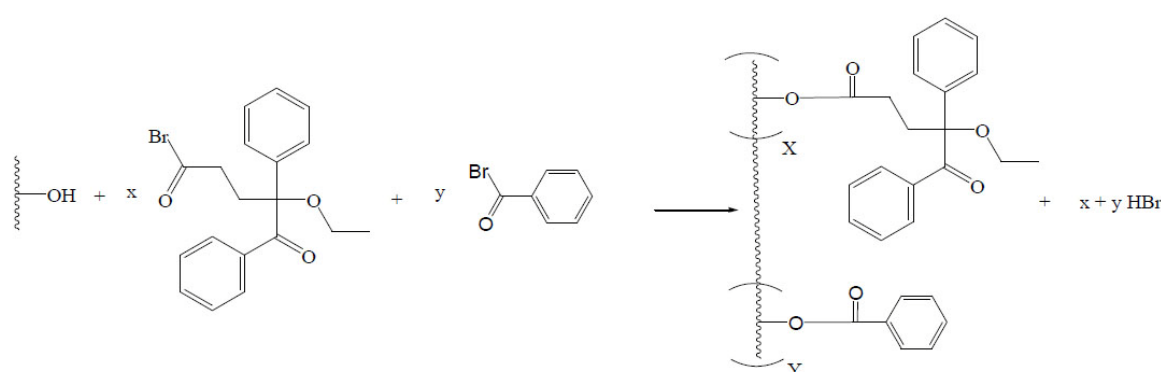


Abbildung 13: Bindung von aktiven Gruppen an die Membranoberfläche^[165].

Molekular geprägte Polymere (C-Terminus selektive Polymere)

Um den C-Terminus des F_c -Fragments zu binden, gab es im Rahmen des *AbCAP*-Projektes den Ansatz, dies über molekular geprägte Polymere (*Imprinted Polymers*) zu erreichen. Die molekular geprägten Polymere basieren auf einem Trägermaterial, in das eine bestimmte Zielstruktur eingepreßt ist.^[166] Dazu wird beispielsweise ein Peptid als Templat vorgelegt und die vorhandenen Freiräume mittels eines Polymers aufgefüllt. Durch anschließende Entfernung des Templates bleibt eine geprägte Struktur in der Oberfläche zurück (Abbildung 14). Diese kann nun im weiteren Verlaufe Moleküle binden, die die gleichen oder zumindest eine sehr ähnliche Struktur wie die Templatstruktur aufweisen.^[167-169] In diesem Projekt befasste sich die Gruppe von Prof. Börje Sellergren (Technische Universität Dortmund) mit der Herstellung von molekular geprägten Polymeren. Als Templat wurde ein Decapeptid verwendet, welches den C-Terminus des F_c -Fragments des Anti-IL-8-Antikörpers darstellt. Das Decapeptid hat ein Molekulargewicht von 1044 Da und folgende Aminosäuresequenz: QKSLSLSPGK. Verschiedene Monomere wurden um das Templat herum polymerisiert und es entstand ein grob körniges Polymer. Aus diesem wurde das Templat mittels einer

Elutionslösung entfernt. Anschließend wurde das Material mit dem in Hepespuffer (pH 7) vorliegendem Antikörper inkubiert. Die Reaktionskontrolle wurde mit einem BCA Assay durchgeführt.^[126]

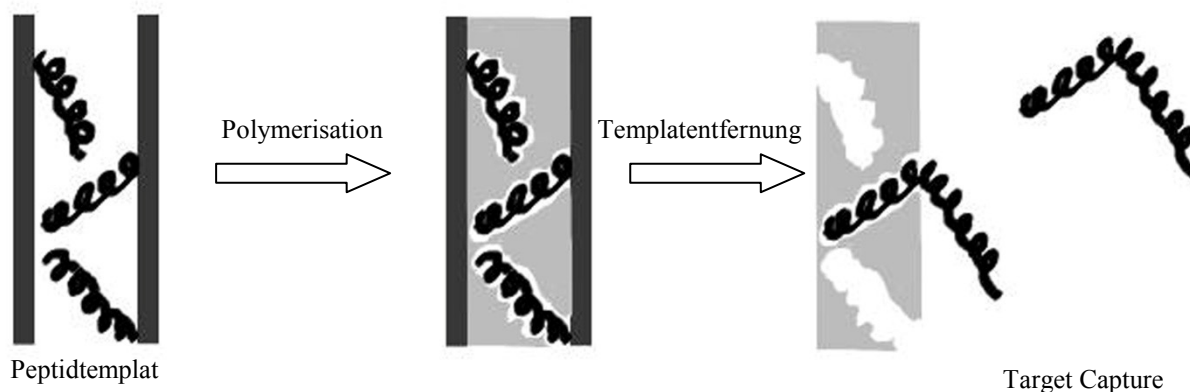


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Herstellung von molekular geprägten Polymeren.

3.6 Eingesetzte Analytische Verfahren

3.6.1 Massenspektrometrische Methoden

Der größte Teil der Messungen zur Charakterisierung des Antikörpers im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels der organischen Massenspektrometrie (MS) durchgeführt. In der Massenspektrometrie werden geladene, gasförmige Analyten untersucht. Deshalb müssen sämtliche zu untersuchenden Stoffe ionisiert und in die Gasphase gebracht werden. Anschließend werden sie separiert und am Schluss nach ihrem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) analysiert.

Ionisierungsmethoden

In dieser Arbeit wurden die meisten Experimente mit der Elektrosprayionisation (ESI, Elektrospray Ionisation) durchgeführt.^[170] Diese Methode ist ausgezeichnet für die Analyse von Biomolekülen geeignet, da es trotz der hohen Spannungen kaum zu Fragmentierungen kommt und somit sehr schonend ionisiert wird.^[171] Für die massenspektrometrischen Untersuchungen müssen die Analyten in Lösung vorliegen. Dabei handelt es sich meistens um

flüchtige Lösungsmittel, wie z.B. Wasser oder Methanol. Durch eine Kapillare gelangt die Analysenlösung zur Ionenquelle, an der eine hohe Spannung anliegt. Dort bilden sich geladene Tropfen, die nun zum Eingang des Massenspektrometers fliegen. Die Tropfen desolvatisieren auf dem Wege dorthin immer mehr, dabei zerstäuben die Tropfen durch Coulombexplosionen in kleinere Tropfen, wenn die elektrostatischen Abstoßungen der Ionen zu groß werden. Auf welchem Wege die Ionisierung genau verläuft, ist noch nicht vollständig geklärt. Es gibt zwei unterschiedliche Modelle dafür. Das *Charge Residue Model* besagt, dass die Tropfen durch Verdampfung so klein werden, dass die Ladung auf der Tropfenoberfläche zu hoch wird und Ionen aus dem Tropfen emittieren.^[172] Im *Ion Evaporation Model* erzeugen die bei der Verdampfung stärker werdenden elektrostatischen Kräfte immer wieder Coulombexplosionen in den Tropfen, bis am Schluss nur einzelne Ionen übrig bleiben.^[173] Je größer das zu ionisierende Molekül ist, desto mehr Ladungen kann es während des Ionisationsprozesses bekommen, was vor allem bei großen Biomolekülen die Analyse erleichtert.^[101] Zur Verringerung der notwendigen Probenmenge wurde die Nano-sprayionisierung entwickelt.^[174] Neben der Verkleinerung der Flüsse in den Nanoliterbereich wurde auch die Spannung auf 1-2 kV verringert. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Ionisations- und Transfereffizienz in das Massenspektrometer erhöht wird.^[175-177] Trotz der schonenden Ionisierung mittels ESI-MS sind mitunter die Analyten noch zu labil, um analysiert werden zu können, wie z.B. Antikörperoligomere. Durch den Ionisationsprozess und die Überführung der Ionen ins Vakuum werden die Ionen stark beschleunigt, bis auf mehrere hundert Meter pro Sekunde. Bei schweren Ionen (> 500 Da) führt dies zu hohen Energien, die im Elektronenvoltbereich liegen können.^[178] Um diese Analyten dennoch effizient in das Massenspektrometer zu überführen und dort analysieren zu können, ist es notwendig, die Ionen mittels Kollisionskühlung zu „kühlen“.^[108, 179-181] Gleichzeitig werden die größeren Ionen dabei im Transfermultipol fokussiert, was den Transfer verbessert, da die Verluste axialer und radialer Bewegungen reduziert werden. Diese Kollisionskühlung und -fokussierung kann durch Gasströme in der Quelle realisiert werden.^[182] Da bei der ESI-MS mit einem stetigen Fluss an Lösungsmittel und Analyten gearbeitet wird, ist eine Kopplung mit Trenntechniken wie der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, high performance liquid chromatography) möglich.

Als zweite standardmäßig eingesetzte Ionisierungsmethode für Biomoleküle ist die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI, Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization) zu nennen.^[183] Bei dieser Technik werden die Analyten mit einer Matrix kokristallisiert. Diese im sehr großen Überschuss (100-100.000 fach) zugegebene Matrix

absorbiert die Energie eines eingestrahnten Laserpulses. Die Matrix besteht meist aus aromatischen Carbonsäurederivaten, die das Licht des UV- bzw. IR-Lasers absorbieren. Durch die aufgenommene Energie kommt es zur Desorption der Matrix, die dabei die Analytmoleküle mitreißt. Der genaue Prozess der dabei ablaufenden Ionisierung ist auch bei dieser Technik nicht vollständig geklärt, wobei es unterschiedliche Erklärungsansätze für die Ionisierung gibt. Als wahrscheinlichster Mechanismus gilt die Desorption in der Matrix vorgebildeter Ionen.^[184] Bei UV-absorbierenden Analyten ist auch die Ionisierung über Photoionisation wahrscheinlich.^[185] Im Gegensatz zur ESI-MS werden bei MALDI-MS überwiegend einfach geladene Molekülionen gebildet.^[100]

Die dritte in dieser Arbeit verwendete Ionisierungstechnik ist das induktiv gekoppelte Plasma (ICP, Inductively Coupled Plasma). Während die ersten beiden Techniken in der Molekülmassenspektrometrie zum Einsatz kommen, ist die ICP-MS eine Technik der Elementmassenspektrometrie. In der ICP-MS gehen die strukturellen Informationen eines Moleküls verloren, allerdings werden dabei Informationen über die Elementzusammensetzung gewonnen. Bei dieser Technik wird in einer Spule ein Argonplasma erzeugt, welches eine Temperatur von 6.000-10.000 K aufweist. In diesem Plasma werden die eingebrachten Analyten desolvatisiert, atomisiert und ionisiert.^[186, 187] Es entstehen überwiegend einfach positiv geladene Atomrümpfe. Mit dieser Methode lässt sich nahezu jedes Element analysieren. Für einige Elemente wie beispielsweise Schwefel ist die Analyse allerdings schwierig, weil nur zwischen 10 und 14 % des Schwefels ionisiert werden, da das erste Ionisierungspotenzial bei 10,36 eV liegt.^[188] Darüber hinaus können spektrale Interferenzen mit anderen Ionen auftreten. Ein Beispiel hierfür ist das Sauerstoffdimer $^{16}\text{O}_2^+$, das mit m/z 32 die gleiche Masse wie das Schwefelisotop $^{32}\text{S}^+$ aufweist.^[132] Um trotzdem das häufigste Schwefelisotop ^{32}S (95,0%) messen zu können, gibt es die Möglichkeit, hoch auflösende Geräte auf Basis doppelfokussierender Sektorfeldgeräte zu nutzen.^[189] Außerdem können Reaktionszellen in Form von Quadrupolen (ICP-QMS) genutzt werden. In dieser Reaktionszelle wird ein reaktives Gas, wie z.B. Sauerstoff, eingeleitet. Die Gasmoleküle kollidieren mit den vorhandenen Ionen und können mit diesen reagieren und beispielsweise Oxide bilden. Im Falle von Schwefel kann z.B. $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ erzeugt werden, dies ist nun mit m/z 48 deutlich von der Interferenz entfernt.^[190]

In Kombination mit der ICP-MS ist die Laserablation für den Probeneintrag eine gängige Methode.^[191, 192] Dabei werden Oberflächen mit Laserstrahlen beschossen und durch die Energie des Lasers wird auf dieser Oberfläche Material verdampft, welches über Gasströme in das Plasma der ICP-MS transportiert wird. Die Oberfläche kann dabei von

Feststoffen^[193] über geologische und Umweltproben^[194-196], über Geloberflächen^[197, 198] bis hin zu Gewebeoberflächen reichen.^[199, 200]

Massenanalysatoren

Zur Analyse der Moleküle müssen diese nach der Ionisation voneinander separiert und analysiert werden, dazu wurden unter anderem Quadrupole verwendet.^[201] Diese bestehen aus vier Metallstäben, wobei an den sich gegenüber liegenden Metallstäben eine Radiofrequenz angelegt wird. Diese wechselt sehr schnell zwischen dem Metallstabpaar hin und her. Damit werden die Ionen im Quadrupol auf eine zirkulierende Bahn gelenkt, durch ein konstantes Grundpotenzial der Metallstäbe wird eine Kollision der Ionen mit den Stäben verhindert. Ionen bestimmter m/z -Werte können durch das Verhältnis der beiden Spannungen stabilisiert oder destabilisiert werden. Dadurch können bestimmte Ionen separiert werden. In vielen MS Geräten sind die Frequenzen für diese Quadrupole auf sehr begrenzte m/z -Werte eingengt. Oft reichen diese m/z -Werte nicht über m/z 4000 hinaus. Damit sind Messungen nativer Antikörper und auch anderer größerer Proteine nicht möglich, da die großen Molekülmassen in deutlich höheren m/z -Bereichen liegen. In den letzten Jahren gab es allerdings Modifikationen, sodass nun andere Frequenzen für die Quadrupole erreichbar sind und damit auch weit höhere m/z -Bereiche bis hin zu m/z 60.000 zugänglich werden.^[108, 202] Es sind damit Messungen von kompletten Viruskomplexen mit bis zu 18 MDa möglich. Die Signale dieses Komplexes liegen im m/z -Bereich von 50.000.^[203]

Eine weitere Analysatortechnik ist die Auftrennung der Ionen über die Flugzeit in einem Flugrohr (ToF, Time of Flight). Dazu werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt, in einer sich anschließenden feldfreien Driftstrecke kommt es im Vakuum zur Auftrennung der Ionen. Dies geschieht durch die unterschiedlichen kinetischen Energien der Ionen, die von ihren m/z -Werten abhängen.^[204] Je größer der m/z -Wert, desto langsamer fliegt das Ion. Die Auflösung eines ToF-Gerätes hängt direkt mit der Flugstrecke zusammen, weshalb oft Reflektron-ToF-Geräte verwendet werden. Bei diesen werden durch einen Ionenspiegel die Ionen zurück in das Flugrohr auf den Detektor gelenkt und somit verlängert sich die Flugstrecke und gleichzeitig die Auflösung enorm.^[183]

Als dritte Technik soll die Sektorfeldtechnik genannt werden. Vor allem als doppelfokussierende Sektorfeld-MS findet diese heutzutage Einsatz bei ICP-MS Geräten.^[205] In einem elektrischen und magnetischen Feld werden die Ionen auf eine konstante Geschwindigkeit gebracht, fokussiert und ihrem m/z -Verhältnis nach im Magnetfeld getrennt. Das anschließende elektrostatische Feld fokussiert die Ionen erneut, was zu einer

hohen Auflösung führt. Die Ionen durchqueren das magnetische und das elektrostatische Feld auf Kreisbahnen, deren Radien von der kinetischen Energie und dem Impuls des Ions abhängig sind. Da die Ladungen, die Energien und die Impulse der Ionen bekannt sind, kann damit die Masse des Ions bestimmt werden.

Eingesetzte MS Geräte

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Reihe von MS-Geräten eingesetzt (vgl. Tabelle 1 in Kapitel 4.1). Der überwiegende Teil der ESI-MS-Messungen wurde mit einem High-mass Q-ToF-MS Gerät durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein von MS Vision (Almere, Niederlande) modifiziertes Micromass Gerät. In Abbildung 15 ist ein Schema des Gerätes dargestellt. Für die Messungen mit diesem Gerät wurden verschiedene Parameter untersucht und optimiert. Bei diesen handelt es sich um die Quellenspannung (1), die Temperatur in der Quelle sowie den dort herrschenden Druck (2), die Spannungen am Cone (3) und am Extraktor (4), sowie die Transferenergie (5) und die Kollisionsenergie (6). Dieses ESI-ToF-MS wurde speziell für die Messung großer Moleküle und die Messung labiler Komplexe optimiert. Der Einsatz einer Z-förmigen Quelle und der Verzicht auf Verneblungsgase sind bei modernen Geräten mit einer Quelle für Nanoflüsse sehr verbreitet.^[206] Um große Moleküle messen zu können, wurde der Quadrupol (Abbildung 15, (5)) im Gerät so verändert, dass ein m/z -Bereich von 30.000 zugänglich wird. Eine weitere Modifikation wurde im Bereich der Quelle vorgenommen. Es wurde die Möglichkeit geschaffen, den Druck in der Quelle zu erhöhen. Das stabilisiert labile Komplexe, da durch das vorhandene Gas die Ionen „gekühlt“ werden. Der Druck wird über ein Ventil mit direktem Zugang zur Quelle geregelt, dort wird dieser auch direkt gemessen (Abbildung 15, (7)).

Darüber hinaus wurden ein MALDI-ToF-MS von Bruker Daltonik (Reflex-III), ein ESI-MS (DECA XP) von Thermo Fisher, ein Synapt G2-S (IMS) von Waters und verschiedene ICP-MS-Geräte: ein ELAN DRC II von Perkin Elmer, sowie von Thermo Fisher ein Element 2, ein Element XR und ein X-Series II eingesetzt.

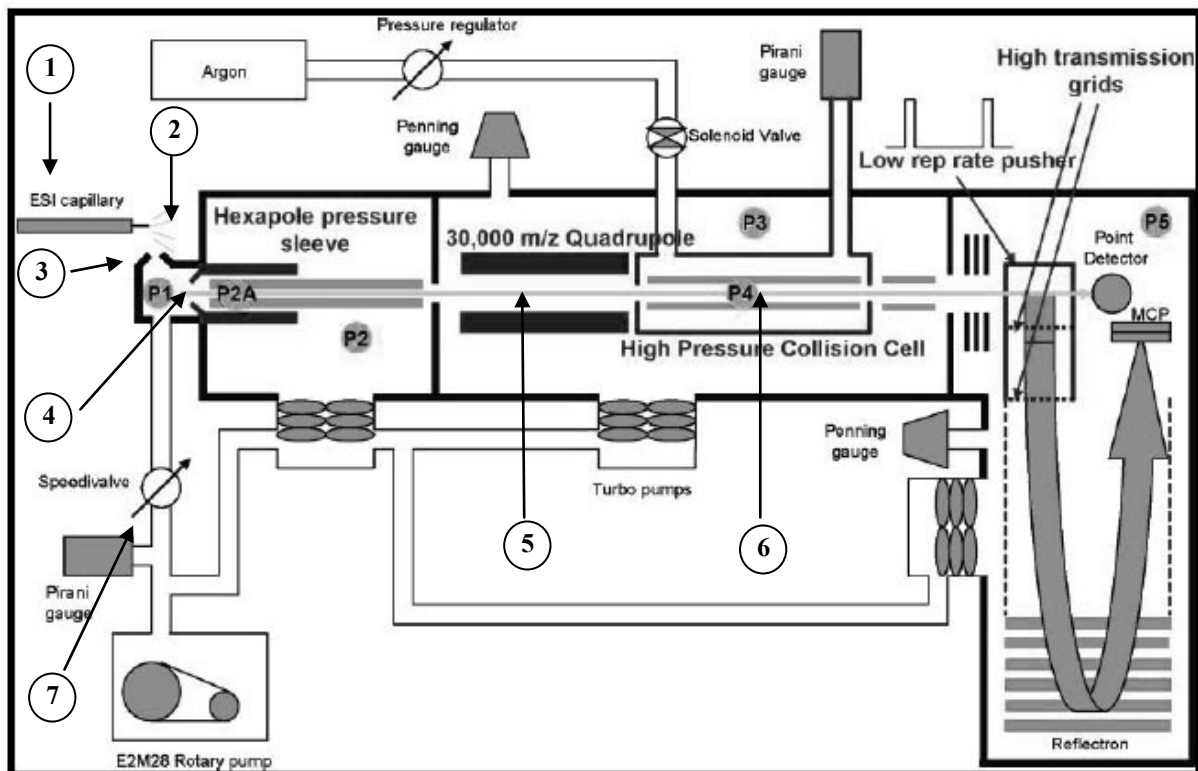


Abbildung 15: Schematische Darstellung des High-mass Q-ToF-MS Gerätes von MS Vision (Niederlande)^[108].

3.6.2 Nicht massenspektrometrische Analyseverfahren

Neben den massenspektrometrischen Verfahren wurden auch andere Analyse- bzw. Messmethoden zur Charakterisierung des Antikörpers und der Trennmaterialien sowie deren Wechselwirkungen in dieser Arbeit eingesetzt.

Eine der eingesetzten Trennmethode ist die Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF). Diese Technik eignet sich zur Trennung von Makromolekülen und Partikeln. Dabei strömt eine Trägerflüssigkeit durch einen dünnen Kanal, dadurch ergibt sich ein parabolisches Flussprofil. Durch einen senkrecht dazu angelegten Fluss eines Trennmediums werden die zu trennenden Analyten an die Kanalwand gedrückt. Je kleiner diese Analyten sind, desto leichter diffundieren sie wieder in die Kanalmitte. Dort werden sie nun durch das parabolische Flussprofil schneller bewegt als die größeren, noch weiter an der Kanalwand befindlichen Analyten. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 16 zu sehen. Es gibt weitere Trennprinzipien, wie z.B. ein weiterer Flüssigkeitsstrom, die Sedimentation oder auch ein thermisches Feld. Die Methode hat einen großen dynamischen Größentrennbereich und benötigt keine Standards, da die Diffusionskoeffizienten theoretisch bestimmt werden können.^[207, 208] Je nach eingesetztem Detektor lassen sich somit unterschiedlichste, zeitaufgelöste Größenverteilungen messen. Für den Nachweis werden optische Detektoren

eingesetzt wie UV-Vis-Absorption oder Streulichtmessung, aber auch die on-line Kopplung an ein ICP-MS ist möglich.

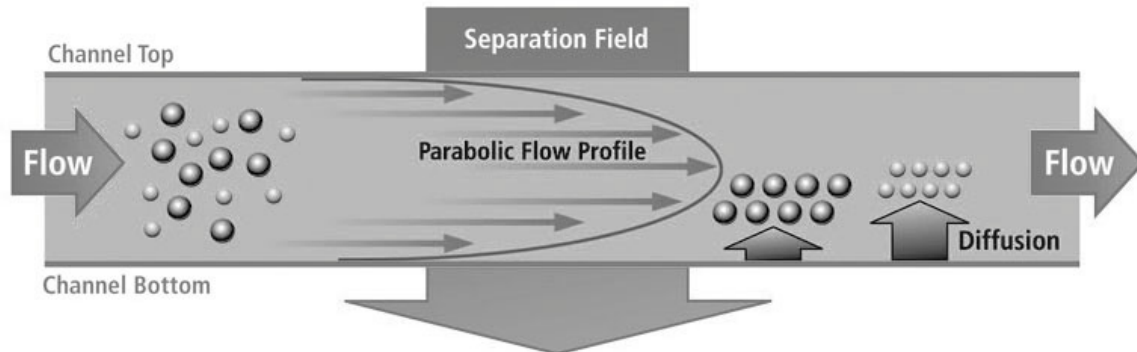


Abbildung 16: Schematische Darstellung der Feld-Fluss-Fraktionierung [Grafik von Postnova Analytics GmbH, Landsberg am Lech, Deutschland].

Als Methode für die Messung der Größenverteilung der polymerbasierten Trennmaterialien ist die dynamische Lichtstreuung (DLS) zu nennen. Diese beruht auf der Streuung des eingestrahlten Laserlichtes durch eine gelöste bzw. suspendierte Probe. Das detektierte Licht, das durch die Partikel gestreut wird, erlaubt Rückschlüsse auf die Größenverteilung eines Moleküls. Es wird allerdings nicht die tatsächliche Molekülgröße bestimmt, sondern der hydrodynamische Radius. Häufig wird die Methode für die Analyse von Polymeren und Biopolymeren, wie z.B. Proteinen, eingesetzt.^[209]

Eine weitere sehr typische Trennmethode in der Protein- und Peptidanalytik ist die Gelelektrophorese.^[210] Bei dieser werden Moleküle in einem Polyacrylamidgel durch ein elektrisches Feld aufgetrennt. Die Trennung erfolgt dabei nach der Größe des Moleküls. Um Ladungseffekte der Moleküle und damit veränderte Trenneigenschaften zu verhindern, wird oft Natriumdodecylsulfat (SDS) dazugegeben. Das SDS überdeckt die eventuelle Eigenladung der Moleküle und sorgt somit für eine im Idealfall ausschließlich größenabhängige Trennung.^[211] Allerdings kann das Trennverhalten durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten zu SDS und somit höhere SDS Beladung des Analyten, beispielsweise bei Membranproteinen, beeinflusst werden.^[212] Die Einführung einer weiteren Trenndimension, vor der eigentlichen Trennung nach der Größe, erweitert die Trennkapazität eines Gels enorm. Dies geschieht über die isoelektrische Fokussierung, die zu einer Auftrennung nach den isoelektrischen Punkten der Moleküle führt.^[213] Es wird damit möglich, während der Trennung auch Proteine mit verschiedenen posttranslationalen Modifikationen voneinander zu unterscheiden.^[214, 215] Des Weiteren können durch den Einsatz von reduzierenden

Reagenzien beispielsweise Antikörper im Gel in leichte und schwere Ketten gespalten werden.^[216] Dies kann vorteilhaft sein, da es in einigen Fällen Sinn macht, nur mit Teilen des Antikörpers zu arbeiten. Außerdem führen einige Arbeitsschritte, wie beispielsweise Markierungsreaktionen, zwangsläufig zur Spaltung des Antikörpers in leichte und schwere Kette.

Eine Standardmethode zur Trennung von Substanzen und anschließenden massenspektrometrischen Analyse ist die HPLC. Bei dieser kann durch den Einsatz geeigneter Trennsäulen eine gute Trennung verschiedenster Analyten erreicht werden. Für Antikörper bietet sich die Größenausschlusschromatographie an, wobei bei dieser nicht einzelne Antikörper voneinander getrennt werden können. Allerdings können Antikörper gut von kleineren Molekülen und auch von Antikörperoligomeren getrennt werden. Die Trennung beruht darauf, dass kleinere Moleküle tiefer in die Poren der Partikel des Trennmediums eindringen und somit eine längere Wegstrecke haben als größere Moleküle, die nur wenig oder gar nicht in die Poren eindringen und somit schneller eluieren.^[217] Ein weiteres Trennmedium sind Ionenaustauscher, beispielsweise starke Anionenaustauscher (SAX).^[217, 218] Bei dieser interagieren negativ geladene Analyten mit der positiv geladenen Oberfläche des Trennmateri als. Je stärker die Ladung oder Basizität des Analyten ist, desto stärker retardiert dieser.

Zum Nachweis von Reaktivitäten von Antikörpern sind Dot-Blots eine einfache und schnelle Analysemöglichkeit.^[219, 220] Bei diesen handelt es sich um eine vereinfachte Form der Western-Blots.^[221] Dot-Blots beruhen auf der Bildung von Immunokomplexen, im Fall von Antikörpern auf der Reaktion des Antikörpers mit dem entsprechenden Antigen. Dabei ist das Antigen auf der Membran immobilisiert und der Antikörper wird dazugegeben. Durch Waschschr itte wird nicht gebundener Antikörper entfernt. Somit sind schnelle Bindungstest und auch Verdünnungsreihen realisierbar. Die Detektion kann über optische Methoden, wie die Färbung mittels Coomassie Blau, oder auch über die Laser Ablation und anschließende ICP-MS Analyse erfolgen.^[222, 223]

4. Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte.

Name	Hersteller/Distributor
3k30 Zentrifuge	Laborzentrifugen GmbH, Osterrode
AF 2000 Focus (AF4 Asymmetrische Feld-Fluss-Fraktionierung)	Postnova, Landsberg am Lech
Analysenwaage CP225D	Sartorius, Göttingen
Blockthermostat BT100 Kleinfeld	VLM, Bielefeld
Blockthermostat LS1 VLM	VLM, Bielefeld
CTC PAL (Autosampler)	Thermo Scientific, Bremen
DECA XP (ESI-MS)	Thermo Scientific, Bremen
DAWN EOS (Lichtstreuendetektor AF4)	Wyatt Technology, Dernbach
ELAN DRC II (ICP-MS)	Perkin Elmer, USA
Element 2 (ICP-MS)	Thermo Scientific, Bremen
Element XR (ICP-MS)	Thermo Scientific, Bremen
High-mass Q-ToF-MS (ESI-ToF-MS)	MS Vision, Niederlande (modifiziertes Micromass Gerät)
HPLC Series 2000	Perkin Elmer, USA
HPLC Series 1050	Hewlett Packard, Waldborn
HPLC 1200	Agilent, Waldborn
New Wave Laser (Laserablation)	ESI, München
Pipetten (Div. Größen)	Eppendorf, Hamburg
Probenschüttler MS3 basic	IKA, Staufen
Probenschüttler Reax top	Heidolph, Schwabach
Purelab Plus System (Reinstwasser)	ELGA, UK

Optilap rEX (Brechungsindexdetektor AF4)	Wyatt Technology, Dernbach
pH Messgerät pH Level 1	Inolab, Weilheim
InLab Micro (pH Messelektrode)	Mettler Toledo, Giessen
Reflex-III (MALDI-ToF-MS)	Bruker Daltonik, Bremen
Rheos 2000x (HPLC)	Flux Instruments, Schweiz
SG Ultra Clear Basic	SG Wasseraufbereitung und Regeneration GmbH, Günzburg
Spectra max PLUS 384 (UV/Vis Plate Reader)	Molecular Devices, USA
Speedvac AES1000 Savant	Savant, USA, Farmingdale
Synapt G2-S (ESI-ToF-MS)	Waters, Eschborn
X-Series II (ICP-MS)	Thermo Fisher, Bremen
Zetasizer Nano-ZS (DLS)	Malvern, Herrenberg
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus, Hanau

4.1.2 Chromatographische Trennsäulen

Tabelle 2: Verwendete chromatographische Säulen.

Name	Hersteller/Distributor
Biosuite 125, 4 µm UHR SEC, 4,6 mm x 300 mm (SEC)	Waters, Eschborn
KW402.5-1E, 1 mm x 250 mm (SEC)	Shodex, Japan
PRP-X100, 10µm 250 x 2,1 mm (SAX)	Hamilton Company, USA

4.1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Name	Hersteller/Distributor
DL-1,4-Dithiothreitol (DTT), 99 %	Acros Organics, Belgien
2-Mercaptoethanol (2-ME), ≥ 99,0 %	Sigma Aldrich, Steinheim
2,2',2'',2'''-(2-(4-(3-(2,5-Dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)-propanamido)-benzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetrayl)-tetraessigsäure	Proteome Factory AG, Berlin
2-(4-Isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure	Macrocyclics, USA

2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), $\geq 99,5 \%$	Fluka, Taufkirchen
α -Cyano-4-hydroxymizinsäure (CHCA), $\geq 98 \%$	Sigma Aldrich, Steinheim
Acetonitril, HPLC grade	J. T. Baker, Griesheim
Ameisensäure, $\geq 98 \%$	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat, $\geq 97 \%$ p.a., ACS	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumformiat, $\geq 99 \%$	Sigma Aldrich, Steinheim
Ammoniumhydrogencarbonat	Sigma Aldrich, Steinheim
Ammoniak-Lösung, 25 %	Riedel de Haen, Hannover
Ammoniumpersulfat, $\geq 99,5 \%$	Sigma Aldrich, Steinheim
Bradford Reagenz (Coomassie Brilliant Blue G-250, Phosphorsäure, Ethanol)	AppliChem, Darmstadt
Cystein-HCl, $\geq 99 \%$, p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
Cystseinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Essigsäure, $\geq 99 \%$	Carl Roth, Karlsruhe
FireSilver staining kit PS-2001	Proteome Factory AG, Berlin
Harnstoff, für Elektrophorese	Sigma Aldrich, Steinheim
Holmiumchlorid	Acros Organics, Belgien
Iod	Sigma Aldrich, Steinheim
Iodacetamid, 98 %	Acros Organics, Belgien
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumiodid, $\geq 99 \%$	Carl Roth, Karlsruhe
Methioninsulfon	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumacetat, $\geq 99 \%$	Fluka, Taufkirchen
Natriumchlorid	VWR, Darmstadt
Natriumdithionit	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS), $\geq 99 \%$	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Phenol	Merck, Darmstadt
Praseodymchlorid	Merck, Darmstadt
Salzsäure, 37 %, Ph.Eur.	Carl Roth, Karlsruhe

Sinapinsäure (SA), $\geq 99,5 \%$	Fluka, Taufkirchen
Terbiumchlorid	Acros Organics, Belgien
Tetrabutylammoniumacetat	Merck, Darmstadt
<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Steinheim
Thioharnstoff	
Triethylamin, $\geq 99,5 \%$	Sigma Aldrich, Steinheim
Triluoessigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), $\geq 99,3 \%$	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl (Tris-HCl)	Boehringer Ingelheim
TritonX-100	Fluka, Taufkirchen
Tween 20	Sigma Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxidlösung, 30 %	Merck, Darmstadt
Zitronensäure, $\geq 99,5 \%$	Riedel de Haen, Hannover

Tabelle 4: Verwendete Proteine.

Name	Hersteller/Distributor
Anti-Interleukin-8 (Anti-IL-8)	Bibitec, Bielefeld
BSA (Bovine Serum Albumin, Rinderalbumin), $\geq 96 \%$	Sigma Aldrich, Steinheim
HSA (Human Serum Albumin, Humanalbumin), 99 %	Sigma Aldrich, Steinheim
IgG (human)	Sigma Aldrich, Steinheim
Interleukin-8	ProSpec, Israel
β -Lactoglobulin	Sigma Aldrich, Steinheim
Lysozym (aus Hühnereiweiß)	Sigma Aldrich, Steinheim
Myoglobin (equine skeletal muscle)	Sigma Aldrich, Steinheim
Antimucin 1 Antikörper (MUC-1)	
Protein A	ProSpec, Israel

Tabelle 5: Verwendete Enzyme.

Name	Hersteller/Distributor
Carboxypeptidase B (<i>porcine pancreas</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
Endo-F2 (Endo- β -N-acetylglucosaminidase F2) (<i>Elizabethkingia meningosepticum</i> , Recombinant, <i>E. coli</i>)	Calbiochem, Schwalbach

Papain (<i>Carica papaya</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
Pepsin (<i>porcine gastric mucosa</i>)	Sigma Aldrich, Steinheim
PNGase F (Peptid-N-Glycosidase F) (<i>Flavobacterium meningosepticum</i>)	New England BioLabs, Frankfurt am Main
Trypsin, sequencing grade, modified	Promega, USA

4.1.4 Puffer

Tabelle 6: Puffersysteme.

Name	Zusammensetzung
Elutionspuffer (molekular geprägte Polymere)	50 mM Tris, 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1 % SDS, pH 10,4
Elutionspuffer (Magnetic Beads)	0,1 M Zitronensäure, pH 3,0
Lagerpuffer (Antikörper)	176 mM Tris, 36 mM NaCitrat, 150 mM NaCl, pH 7
Reaktionspuffer (MeCAT)	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, pH 7
Neutralisationspuffer (Magnetic Beads)	1 M Tris, pH 8-9
PBST (Magnetic Beads)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 2 mM KH ₂ PO ₄ , 0,5 % Tween 20 pH 7,4
Proteolysepuffer (Papain)	75 mM NaCl, 2 mM Na ₂ H ₂ EDTA, 75 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM Cystein-HCl, pH 7,0
Reaktionspuffer (DPITFB)	50 mM Tris-HCl, 30 % Acetonitril, pH 6,7
Reaktionspuffer (Iod-Kaliumiodid)	0,1 M Tris-HCl, pH 6,5-7
Reaktionspuffer (PNGaseF)	0,5 M Natriumphosphat, pH 7,5

4.1.5 sonstige Materialien

Tabelle 7: Sonstige Materialien.

Name	Hersteller/Distributor
Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Zentrifugenfilter)	Merck Milipore, Schwalbach
Nanospray Emitter (Borosilikatglas)	Thermo Scientific, USA
Roti-MagBeads Protein A	Carl Roth, Karlsruhe

Slide-A-Lyzer MINI Dialysis Devices (Dialysefilter)	Thermo Scientific, USA
OMIX-Tips (C4, C18) (Entsalzungsspitzen)	Varian, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Gelelektrophorese

Die Durchführung der zweidimensionalen Gelelektrophorese erfolgte durch Dr. Karola Lehmann an der Proteome Factory, wofür ein von der Proteome Factory abgeändertes Protokoll verwendet wurde. Für die erste Dimension wurden 70 µg Protein verwendet und bei 8820 Vh isoelektrisch fokussiert (IEF-Gel). Das Gel bestand aus 9 M Harnstoff, 4 % Acrylamid, 0,3 % Piperazindiacrylamid, 5 % Glycerol, 0,05 % TEMED, 0,02 % Ammoniumpersulfat und 2 % Trägerampholyten (pH 2-11). Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten inkubiert, wobei der Puffer 125 mM Triphosphat (pH 6,8), 40 % Glycerol, 65 mM DTT und 3 % SDS enthielt. Danach wurde das Gel auf – 80 °C abgekühlt. Für die zweite Trenndimension wurde ein SDS-PAGE-Gel (20 cm x 30 cm x 0,1 cm) hergestellt, das aus 375 mM Tris-HCl Puffer (pH 8,8), 12 % Acrylamid, 0,2 % Bisacrylamid, 0,1 % SDS und 0,03 % TEMED bestand. Das aufgetaute IEF-Gel wurde an das SDS-PAGE-Gel angelegt und die Elektrophorese begonnen. Diese wurde bei 140 V für 5 h 15 min durchgeführt und zum Schluss wurden die Proteinspots mit einem FireSilver Staining Kit PS-2001 angefärbt.^[224]

4.2.2 Umpufferung/Entsalzung

Umpufferung

Der Anti-Interleukin-8 Antikörper lagerte in einem Tris Puffer (176 mM Tris, 36 mM Na-Citrat, 150 mM NaCl, pH 7,0) bei -20 °C und der MUC-1-Antikörper ebenfalls bei -20 °C in einem PBS Puffer. Zur weiteren Verwendung und Analyse wurden die Antikörper wie folgt umpufferf.

Wenn nicht anders angegeben, wurden Amicon Ultra-0.5 Zentrifugenfilter (Merck Milipore) eingesetzt, wobei Membranen mit Cut-Offs von 3 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa und 100 kDa entsprechend der Zielstellung zum Einsatz kamen. Dazu wurden die Filter mit Probe gefüllt

und gegebenenfalls bis auf 500 μL Gesamtvolumen mit dem Zielpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden die Filter in den dafür vorgesehenen Vials für 15 Minuten in einer 3k30 Zentrifuge, bei 14.000 rpm und 20 °C, zentrifugiert. Je nach Anwendung wurde das Zentrifugat verworfen oder gesammelt. Die Filter wurden nun mit 450 μL Puffer gefüllt und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zwei weitere Male wiederholt. Zur Rückgewinnung der Probe wurden die Filter umgedreht und so in neue Vials gesteckt. Diese wurden erneut für 2 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Bei Bedarf wurden die aufkonzentrierten Proben verdünnt.

Alternativ wurde eine Dialyse durchgeführt. Dazu wurden 20-50 μL Probe in einen Dialysefilter pipettiert. Anschließend kam der Filter in einen Schaumstoffschwimmer in ein Gefäß mit 500 mL Zielpuffer, der ständig gerührt wurde. Nach drei Stunden wurde der Puffer erneuert und drei weitere Stunden gerührt.

Entsalzung

Für die Entsalzung der Proben wurden OMIX-Tips (C4 oder C18, 10 μL , Varian) verwendet. Dazu wurden die Spitzen mit Acetonitril und anschließend einer Mischung aus Wasser und Ameisensäure (99,5: 0,5, v/v) durch jeweils dreimaliges Aufziehen und Ausstoßen gewaschen und konditioniert. Nach der Konditionierung wurde der Analyt durch zehnfaches Aufziehen und Ausstoßen der Analytlösung auf das Material geladen. Anschließend wurde mit der Mischung aus Wasser und FA gewaschen und mit einer Mischung aus Wasser, Acetonitril und FA (49,75:49,75:0,5, v/v) eluiert.

4.2.3 MALDI-MS-Messungen

Für MALDI-MS-Untersuchungen wurde ein Reflex-III (Bruker) verwendet. Jeweils 1 μL , der zuvor entsalzten Probe wurde mit 1 μL Matrixlösung (3 mg/mL Matrix, gelöst in 49,95 % Wasser, 49,95 % Acetonitril und 0,5 % FA) auf der Probeplatte gemischt und getrocknet.

Die Messungen am Reflex-III erfolgten bei 50 % Energie des Lasers (250 μJ , 337 nm), einer Quellenspannung von 20 kV und einer Detektorspannung von 1,85 kV.

4.2.4 ESI-MS-Messungen

Die ESI-MS-Messungen erfolgen, wenn nicht anders angegeben, bei einer Antikörperkonzentration von 1 und 3 mg/mL in 200 mM Ammoniumacetat (pH 7). Darüber hinaus

wurden 200 mM Ammoniumformiat (pH 7), 200 mM Triethylammoniumacetat (pH 7), sowie 0,1 %ige (v/v) organische Säuren (FA, pH 2,7; AA, pH 3,2; TFA, pH 2,0) zum Einsatz gebracht.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden die ESI-MS Messungen mit einer Nano-ESI-Quelle an dem High-mass Q-ToF-MS durchgeführt. Dabei wurden folgende Parameter verwendet: 20 mbar Quellendruck, 30 °C Quelltemperatur, 1 kV Quellenspannung, 20 V Conespannung, 2 V Extraktorspannung, 4 eV Transferenergie (ion energy) und 0,1 bis 200 eV Kollisionsenergie. Das Probenvolumen lag zwischen 5 und 10 µL. Alle gezeigten ESI-MS Spektren sind eine Aufsummierung von je 100 Einzelspektren.

Die Darstellung der dekonvolierten Spektren erfolgte mittels MaxEnt 1 (Maximum Entropie) von MassLynx 4.0. Dazu wurde im ESI-MS-Spektrum eine Untergrundkorrektur vorgenommen (Polynomial Grad 1, 40 % Fläche unterhalb des Graphen, Toleranz 0,01), anschließend eine Glättung des Spektrums (Glättungsfenster (Kanäle) ± 3 mit einem Savitzky-Golay-Filter) und schlussendlich wurde dekonvoliert (Massenbereich 140000 – 155000 Da, Auflösung 1 Da/Kanal, stetige Gleichverteilung des Signals mit einer Halbwertsbreite von 4,5 Da). Aus dem errechneten Spektrum wird auch ein ESI-MS-Spektrum mit den ursprünglichen Ladungen moduliert, um dieses mit dem Ausgangsspektrum vergleichen zu können.

4.2.5 Reduktion von Antikörpern

Für die Reduktion der Antikörper wurden Lösungen von TCEP in einem Phosphatpuffer (2,25 mmol Dinatriumhydrogenphosphat und 4,5 mmol Natriumchlorid) von 2 µmol/L, 4 µmol/L, 20 µmol/L, 40 µmol/L, 200 µmol/L und 400 µmol/L eingesetzt, die jeweils mit gleichen Volumina der Antikörperlösung, mit einer Konzentration von 3 mg/mL, gemischt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur bzw. bei 0 °C inkubiert wurden. Zum Stoppen der Reduktion wurde das Gemisch in einem 10 kDa Cut-off Filter zentrifugiert und das Reduktionsmittel abgetrennt.

Die Reduktion für die tryptische Proteolyse wurde mit einer 50 mM wässrigen TCEP Lösung durchgeführt und für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert. Von der TCEP Lösung wurde ein 20 facher Überschuss, bezogen auf die Anzahl an möglichen Disulfidbrücken, eingesetzt.

Alle Reduktionen für die Polymeranalytik mittels TCEP wurden ebenfalls mit einer 50 mM TCEP Lösung durchgeführt. Diese Reduktionen fanden für eine Stunde bei Raumtemperatur

statt. Da die Konzentration des Antikörpers in diesen Fällen unbekannt war, wurden große Überschüsse an Reduktionsmittel (100 μ L, 50 mM TCEP Lösung) eingesetzt.

4.2.6 Proteolysen von Antikörpern

Trypsin

Für die Proteolysen mit Trypsin wurde der Antikörper zuerst in 9 M Harnstoff überführt und mit TCEP reduziert. Anschließend wurden die Cysteine mit 30 mM Iodacetamid für eine Stunde in Dunkelheit und bei Raumtemperatur alkyliert. Anschließend wurde der Antikörper in einer 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung mit Trypsin für zwölf Stunden bei 37 °C inkubiert. Das Verhältnis von Antikörper zu Trypsin war 10:1 (m/m).

Im Falle der polymergebundenen Antikörper wurde auf die Alkylierung verzichtet und da die Konzentration an Antikörper nicht bekannt war, wurde ein großer Überschuss an Trypsin eingesetzt (25 μ L einer 0,01 g/L Trypsin-Lösung, gelöst in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat).

Papain

Das Papain (2 mg/mL) wurde im Proteolysepuffer (75 mM NaCl, 2 mM Na₂H₂EDTA, 75 mM Na₂HPO₄, 10 mM Cystein-HCl, pH 7,0) gelöst und für 2 Minuten bei 37 °C aktiviert. Der Antikörper wurde in den gleichen Puffer überführt, die Konzentration betrug 2 mg/mL. Zum Antikörper wurde die Papainlösung im Verhältnis 1:10 (v/v) dazugegeben und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Pepsin

Für die Proteolyse mittels Pepsin wurde der Antikörper in einen 200 mM Ammoniumpuffer (pH 4) überführt, die Konzentration wurde dabei auf 2 mg/mL eingestellt. Das Pepsin wurde mit einer Konzentration von 0,2 mg/mL ebenfalls in dem Ammoniumacetatpuffer gelöst. Nach der Zugabe der Pepsinlösungen wurde bei 37 °C inkubiert. Dabei wurden Proben nach einer, nach zwei und nach 24 Stunden entnommen.

Peptid-N-glycosidase F (PNGaseF)

Zur Proteolyse mit PNGaseF wurden 5 μ L Antikörperlösung (3 mg/mL) mit 4 μ L fertiger PNGaseF-Lösung und 1 μ L mitgeliefertem Reaktionspuffer (0,5 M Natriumphosphat, pH 7,5) gemischt und für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert.

Carboxypeptidase B

Die Proteolyse mittels Carboxypeptidase B wurde in PBS-Puffer durchgeführt. Dazu wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 5 mg/mL hergestellt und mit der Antikörperlösung (5 mg/mL) gemischt und für 20 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Endo- β -N-acetylglucosaminidase F2 (Endo-F2)

Bei der Proteolyse mit Endo-F2 wurden 10 μ L der Anti-IL-8 Antikörperlösung (10 mg/mL in 5 mM Natriumphosphat, 0,1 % TritonX-100, pH 7) bei 37 °C über Nacht mit 20 μ L der Proteaselösung inkubiert. Diese bestand aus 2 Miliunits Endo-F2 in 20 μ L eines 20 mM Natriumacetatpuffers (pH 5).

4.2.7 Antikörperaufreinigung mit Magnetic Beads

Als Möglichkeit zur selektiven Aufreinigung von Antikörpern bzw. F_c -Fragmenten wurden Magnetic Beads eingesetzt, auf deren Oberfläche Protein A immobilisiert war. Zur Entfernung des Lagerpuffers wurden die Magnetic Beads mittels eines Magneten aus der Suspension abgetrennt und die Suspension entfernt. Die Beads wurden anschließend in dem dreifachen Volumen der Suspension mit PBST resuspendiert. Danach wurde diese PBST-Waschlösung entfernt und drei weitere Male mit PBST gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Beads erneut mit dem dreifachen Startvolumen suspendiert und die zu reinigende Lösung dazugegeben. Dabei wurde zu der Suspension die Antikörper bzw. F_c -Fragment haltige Lösung gegeben, wobei auf 20 μ L Beads 1 μ g Antikörper kamen. Diese Mischung wurde für eine Stunde inkubiert, anschließend die Lösung entfernt und dreimal mit 50 μ L PBST (pro 20 μ L Beads) gewaschen. Zur Elution des gebundenen F_c -Fragments oder des Antikörpers wurden 25 μ L Elutionslösung pro 20 μ L Beadsuspension gegeben und für fünf Minuten geschüttelt, die Lösung entfernt und mit 40 μ L Neutralisationspuffer pro 20 μ L Beads gemischt.

4.2.8 Antikörpermarkierungen

SCN-DOTA

Für die Markierung mittels *p*-SCN-Bn-DOTA wird im ersten Schritt der SCN-DOTA Komplex für eine Stunde bei 37 °C mit dem entsprechenden dreiwertigen Lanthanidion (HoCl_3 bzw. TbCl_3 in 20 mM Tetrabutylammoniumacetatpuffer, pH 5,5) vermischt, sodass es zu einer Komplexbildung des Metallions kommt, das Metallion liegt in einem zweifachen

Überschuss vor. Im eigentlichen Markierungsschritt wird ein 40-facher bzw. 100-facher molarer Überschuss des *p*-SCN-Bn-DOTA mit dem ein molaren Antikörper für vier Stunden bei 20 °C inkubiert. Die Reaktion findet in einem 0,1 M Carbonat-Bicarbonatpuffer (pH 9) statt. Der Überschuss an Markierungsreagenz wurde mit Zentrifugenfiltern abgetrennt. Für die Markierungen des Anti-IL-8 Antikörpers wurde Holmium als Lanthanoid eingesetzt und für den MUC-1-Antikörper Terbium.^[76] Die Markierungsreaktion mittels *p*-SCN-Bn-DOTA wurde für den Anti-IL-8 Antikörper von Dr. Larissa Müller (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Fachbereich 1.1) und für den MUC-1-Antikörper von Dr. Charlotte Gießen (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Fachbereich 1.1) durchgeführt.

MeCAT

Zur Markierung mit dem MeCAT-Reagenz mit Malinimidfunktionalität wurde der Antikörper mittels Zentrifugenfiltern in den MeCAT-Reaktionspuffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2,5 mM EDTA, pH 7) umgepuffert (cut-off 50 kDa). Die Antikörperlösung wurde durch die Zentrifugenfilter auf 50 µL Volumen eingengt, wodurch sich eine Konzentration von 5 mg/mL ergab. Anschließend wurde die Antikörperlösung mit 200 µL einer 4 mM TCEP Lösung gemischt und bei 37 °C und 350 rpm für 30 Minuten inkubiert. Für die TCEP Lösung wurden 4 µL einer 0,5 M TCEP Lösung in 0,5 mL MeCAT-Reaktionspuffer verdünnt. Nach der Reduktion mit TCEP wurde durch den erneuten Einsatz von Zentrifugenfiltern das TCEP entfernt. Nun wurde ein 20-facher molarer Überschuss des MeCAT-Reagenz dazugeben. Das MeCAT-Mal selbst wurde zuvor in 5 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 6,5) gelöst. Die Mischung aus MeCAT-Reagenz und reduziertem Antikörper wurde für 60 Minuten bei 37 °C und 350 rpm inkubiert. Im letzten Schritt wurde die Lösung erneut mit Zentrifugenfiltern gereinigt und der Überschuss an MeCAT-Reagenz entfernt. Als Lanthanoid wurde Praseodym eingesetzt.

Iodacetamid

Die Alkylierung mittels einer 30 mM Iodacetamidlösung erfolgte bei Raumtemperatur, unter Ausschluss von Licht und für eine Stunde, wobei 17,8 µL Iodacetamidlösung in 150 µL einer zuvor reduzierten Antikörperlösung (3 mg/mL) gegeben wurde. Nach einer Stunde wurde mit einem Zentrifugenfilter in 200 mM Ammoniumacetatpuffer (pH 7) umgepuffert und überschüssiges Iodacetamid entfernt.

Iod

Für die Iodierung des Antikörpers wurde mit einer Iod-Kaliumiodidlösung iodiert. Diese wurde frisch hergestellt, indem 83 mg Kaliumiodid in 10 mL Wasser gelöst wurden und Iod

bis zur Sättigung dazugegeben wurde. Zur Iodierung wurde der Antikörper im Reaktionspuffer (Tris-HCl) gelöst und die Konzentration auf 1mg/mL eingestellt. Zu 40 µL Antikörperlösung wurden 4 µL Iod-Kaliumiodidlösung gegeben und die Mischung für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µL einer 50 mM Natriumdithionitlösung dazugegeben, um die Reaktion zu stoppen, und dies für zehn Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

4.2.9 Ionenmobilitätsmassenspektrometrie (IMS) Messungen

Für die Messungen mittels eines Synapt G2-S (Waters, USA) wurden der Anti-IL-8-Antikörper, der reduzierte Antikörper, sowie der MeCAT markierte Antikörper in 200 mM Ammoniumacetat umgepuffert. Die Kapillarspannung war 1,15 kV, die Quelltemperatur 60 °C, die Transferenergie 4 eV, die Kollisionsenergie 4 eV und die Conespannung 150 V.

4.2.10 Dot-Blot und LA/ICP-MS Messungen

Für die LA/ICP-Analysen der Dot-Blots wurde ein Element XR (Thermo Scientific, USA) mit einem New Wave Laser (ESI, USA) gekoppelt. Dabei wurde die Energie des Lasers auf 32 % eingestellt und die Frequenz auf 20 Hz. Die Spotgröße war 250 µm und die Ablationsgeschwindigkeit 150 µ/s. Die Dot-Blots wurden auf einem Gel hergestellt. Dazu wurde das Gel für 10 min mit dem Antigen inkubiert, welches in PBST gelöst war. Im nächsten Schritt wurde mittels 5 %igem Milchpulver in PBST für 30 min der Rest des Gels blockiert und dreimal für fünf Minuten mit PBST gewaschen. Der Anti-IL-8 Antikörper wurde in verschiedenen Verdünnungen (von 1:20, 1:200, 1:400, 1:800 und 1:1200) der Stammlösung von 5mg/mL auf das Gel aufgebracht und für zwei Stunden inkubiert. Zum Schluss wurde noch fünfmal mit PBST für jeweils 5 min gewaschen. Die Herstellung des Gels sowie deren Messungen wurden von Dr. Larissa Müller (Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Fachbereich 1.1) durchgeführt.

4.2.11 Antikörperkomplexe

Die Darstellung von Protein-Antikörper-Komplexen mit dem Anti-IL-8-Antikörper wurde durch einfache Inkubation bei Raumtemperatur im entsprechenden Puffer durchgeführt.

Für die Bildung des Antigen-Antikörper-Komplexes wurde der Antikörper mit einem zehnfachen Überschuss an Antigen für zwei Stunden bei Raumtemperatur direkt in 200 mM Ammoniumacetatpuffer inkubiert. Anschließend wurde mit einem 50 kDa Cut-Off Filter gereinigt, um überschüssiges Antigen zu entfernen.

Der Komplex aus Antikörper und Protein A wurde durch Inkubieren des Antikörpers mit einem zehnfachen Überschuss an Protein A in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur hergestellt. Die Abtrennung von nicht gebundenem Protein A erfolgte mittels 100 kDa Cut-Off-Filtern, wobei gleichzeitig in 200 mM Ammoniumacetat, bzw. 200 mM Triethylammoniumacetat umgepuffert wurde.

4.2.12 Feld-Fluss-Fraktionierungs (FFF) Messungen

Für die Messungen wurden jeweils 1,5-2 mg Polymer in 1 mL Wasser bzw. in einem PBS Puffer gelöst, welcher auch als Laufpuffer diente. Als Referenz diente BSA. Im Falle der Messungen des Anti-IL-8 Antikörpers lag die Konzentration bei 5 mg/mL. Die FFF-Messungen wurden mit einem AF 2000 Focus durchgeführt und eine Polyethersulfon-Membran verwendet, die Poren in der Größe von 4 kDa aufweist. Zur Detektion wurden die statische Lichtstreuung, UV-Absorption (340 nm) sowie der Brechungsindex gemessen.

4.2.13 Dynamische Lichtstreuungs (DLS) Messungen

Um die Proben für die DLS vorzubereiten, wurden diese filtriert und anschließend intensitäts- und anzahlgewichtet analysiert. Die Messungen wurden an Polymeren (1,5-2 mg Polymer in 1 mL Wasser) und Anti-IL-8 Antikörper (5 mg/mL) mit einem Zetasizer von Malvern vorgenommen, wobei Partikel unterhalb von 1 nm nicht mehr detektiert werden konnten. Für das als Referenz verwendete BSA wurde ein Partikeldurchmesser von 2,7 nm angenommen.^[225]

4.2.14 Immobilisierte Antikörper-Polymer-Komplexe

Zur Analyse der Antikörper, die an die unterschiedlichen Polymere gebunden wurden, wurde eine tryptische Proteolyse durchgeführt, wobei in beiden Varianten der Polymere erst eine Reduktion und anschließend eine tryptische Proteolyse durchgeführt wurde.

Im Fall der membrangebundenen Polymere aus der Gruppe von Prof. Ulbricht wurde eine mit Polymer modifizierte Membran mit einer verglichen, die nach der Modifizierung mit einer Antikörperlösung inkubiert wurde. Zur Analyse der polymergebundenen Antikörper wurden im ersten Schritt die Membranen mit 5 mL einer 9 M Harnstofflösung gespült und anschließend mit einer 50 mM TCEP-Lösung für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die Membranen dreimal mit 5 mL der Harnstofflösung gewaschen und anschließend diese Waschlösungen zusammen mit der Reduktionslösung vereinigt. Danach wurden die Membranen mit 5 mL einer 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung gespült und ein großer Überschuss der Trypsinlösung (25 µL einer 0,01 g/L Trypsin-Lösung, gelöst in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat) zugegeben, um eine vollständige Proteolyse zu gewährleisten. Das Gemisch wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 5 mL 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung gewaschen und ebenfalls wieder die Waschlösungen mit der Reaktionslösung vereinigt. Anschließend wurde für die Elution zu den Membranen 5 mL 1 M Natriumchloridlösung gegeben und dies jeweils zwei Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 5 mL 1 M Natriumchloridlösung wurden diese auch vereinigt. Im letzten Schritt wurden alle Lösungen auf etwa 30 µL für die ESI bzw. MALDI-MS-Analysen eingeeengt.

Zur Untersuchung der an die molekular geprägten Polymere gebundenen Antikörper wurden im ersten Schritt die Partikel mit einer 50 mM TCEP-Lösung versetzt und für 30 Minuten bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurden die Partikel gewaschen und der Überstand gesammelt. Im nächsten Schritt wurden die Partikel in einer 50 mM Ammoniumhydrogencarbonatlösung suspendiert und es wurde eine Trypsinlösung (25 µL einer 0,01 g/L Trypsin-Lösung, gelöst in 25 mM Ammoniumhydrogencarbonat) zugegeben. Die Mischung wurde nun bei 37 °C über Nacht inkubiert. Nach der Proteolyse wurde ebenfalls wieder gewaschen und der Überstand gesammelt. Im letzten Schritt wurden zur Elution des im Polymer verbleibenden Peptids die Partikel in der Elutionslösung (50 mM Tris, 7 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 1 % SDS, pH 10.4) suspendiert. Nach zwei Stunden wurde die Elutionslösung abgenommen und mit weiterer gewaschen, schlussendlich wurden diese wieder vereint. Alle gesammelten Lösungen wurden auf etwa 30 µL für die ESI bzw. MALDI-MS-Analysen eingeeengt.

4.2.15 Bestimmung des Verhältnisses von Methionin und Cystein

Für die Hydrolyse der Proteine wurde Perameisenäure eingesetzt, die frisch hergestellt wurde. Dazu wurden 0,9 mL Ameisensäure, 0,1 mL Wasserstoffperoxidlösung und 5 µL Phenol

gemischt und für 30 min stehen gelassen, bis eine gelbe Färbung entstand. Zur Hydrolyse der Proteine wurden jeweils 200 µL des Standards (Lysozym, 3 mg/mL) und 200 µL Antikörperlösung (3 mg/mL laut Bradford Assay) mit 100 µL Perameisensäure gemischt. Diese Mischungen wurden für 15 min auf 50 °C erhitzt, wobei zwischendurch geschüttelt wurde. Im nächsten Schritt wurden die Proben für fünf Minuten auf Eis gestellt und anschließend bei 50 °C in einer SpeedVac getrocknet. Die Rückstände wurden in jeweils 300 µL 6 molarer Salzsäure gelöst und für 24 Stunden bei 100 °C inkubiert. Zum Schluss wurde zentrifugiert und jeweils 150 µL in Eppendorfgläser überführt und eingedampft. Zur Messung wurden die Proben in Wasser gelöst und mittels HPLC/ICP-MS analysiert. Dafür wurde eine Series 1050 HPLC (Hewlett Packard, USA) ausgestattet mit einer PRP-X100 (SAX) Säule (10 µm, 250 mm x 2,1 mm, Hamilton Company, USA) an ein Quadrupol ICP-MS, ein X-Series II (Thermo Scientific, USA) gekoppelt. Gemessen wurde das Signal $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ (m/z 48), welches durch 10 % Sauerstoff im Reaktionsgas Helium erzeugt wurde. Die Eluenten waren: (A) 25 mM Ammoniumacetat (pH 8) und (B) 250 mM Ammoniumacetat (pH 8). Der chromatographische Lauf umfasste zehn Minuten, bei denen zuerst isokratisch von 100 % A 2,2 Minuten und anschließend linear auf 100 % Eluent B bei 5,8 gesteigert und kurz gehalten wurde. Es folgten Rückspülen auf 100 % A und Spülen für 2,5 min.

4.2.16 Antikörperquantifizierung mittel ICP-MS

Bei den Messungen mit dem ELAN DRC II (Perkin Elmer, USA) wurde eine dynamische Reaktionszelle verwendet und das Signal $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$ (m/z 48) gemessen. Dazu wurde ein HPLC System der Serie 2000 (Perkin Elmer, USA) eingesetzt. Dabei wurde eine 5 µL Schleife bei einer Flussrate von 300 µL/min und einem Injektionsvolumen von 25 µL genutzt. Der Eluent der isokratischen Trennung bestand aus 150 mM NaCl, 20 mM Tris (pH 7,3). Als Standards wurden die Proteine HSA und Myoglobin in den Konzentrationen 3, 1,5, 1, 0,5, 0,25 und 0,1 mg/mL eingesetzt, mit jeweils drei Injektionen und zwei anschließende Blankinjektionen. Als SEC-Säule wurde eine Biosuite 125 (4 µm UHRSEC, 4,6 mm x 300 mm, Waters, USA) eingesetzt.

Die vergleichenden Analysen erfolgten mit einem Sektorfeld-ICP-MS Element 2 (Thermo Scientific, USA), wobei die Signale ^{32}S und ^{34}S gemessen wurden. Die genutzte HPLC Anlage war ein Rheos 2000x (Flux Instruments, Schweiz) mit einem CTC PAL Autosampler (Thermo Scientific, USA). Die eingesetzte Schleife hatte ein Volumen von 3 µL, bei 3 µL Injektionsvolumen. Als Eluent wurde 50 mM Ammoniumacetat (pH 6,8) verwendet, bei einer

Flussrate von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Bei der SEC-Säule handelte es sich um eine KW402.5-1E, 1 mm x 250 mm (Shodex, Japan). Der verwendete Standard war HSA in den Konzentrationen 0,5, 0,25, 0,1 und 0,01 mg/mL. In diesen Messungen wurde er in unterschiedlichen Verdünnungen von 1:2, 1:4, 1:10 und 1:20 eingesetzt.

4.2.17 Photometrische Proteinbestimmung nach Bradford

Für die photometrische Proteinbestimmung nach Bradford wurden in einer Mikrotiterplatte die Proben, die Standards und eine Kontrollprobe ohne Protein aufgetragen.^[127] Als Standard dienten BSA-Lösungen (1, 0,5, 0,2, 0,1 0,05 und 0,01 mg/mL). Von den Proben und Standards wurden jeweils 10 μL in eine Kavität gegeben und mit 100 μL Bradford Reagenz (Coomassie Brilliant Blue G250, Phosphorsäure, Ethanol) gemischt. Die Messungen wurden mit einem Spectra max PLUS 384 von Molecular Devices (Sunnyvale, USA), bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Für die Standards wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, für die Probe eine Einfachbestimmung. Für Quantifizierungen im Rahmen der ICP-MS Messungen wurden die Standards fünfmal gemessen und die Proben dreimal.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 MS-basierte Antikörpercharakterisierung

Die Charakterisierung von Antikörpern mittels massenspektrometrischen Analysen ermöglicht die Aufklärung unterschiedlicher Eigenschaften des Antikörpers, die für dessen Fähigkeit zur Bindung anderer Moleküle in nicht kovalenten Komplexen entscheidend sind. Diese Arbeiten erfolgen am Beispiel des Anti-Interleukin-8-Antikörpers.

5.1.1 Voruntersuchungen

Gelelektrophorese

Im Rahmen der Voruntersuchungen des Anti-IL-8-Antikörpers wurde, vor den massenspektrometrischen Analysen, eine Untersuchung auf prozessbedingte Proteinverunreinigungen durchgeführt. Dazu wurde die zweidimensionale Gelelektrophorese eingesetzt, da diese eine hohe Trennkapazität bietet und gleichzeitig Hinweise auf mögliche Heterogenitäten des Antikörpers liefert. Die Trennungen wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt, wodurch der Antikörper in leichte und schwere Ketten aufgespalten wurde. Als Analysematerial standen Lösungen des Antikörpers vor und nach einer Aufreinigung zur Verfügung, wobei die Aufreinigung durch Bindungen des Antikörpers an immobilisiertes Protein A erfolgte. Die Aufreinigung mit einer Protein-A-Säule wurde im Zuge der Produktion des Antikörpers von der Bibitec GmbH (Bielefeld) durchgeführt und nur mit diesem aufgereinigten Antikörper wurde gearbeitet. Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist in Abbildung 17 zu sehen.

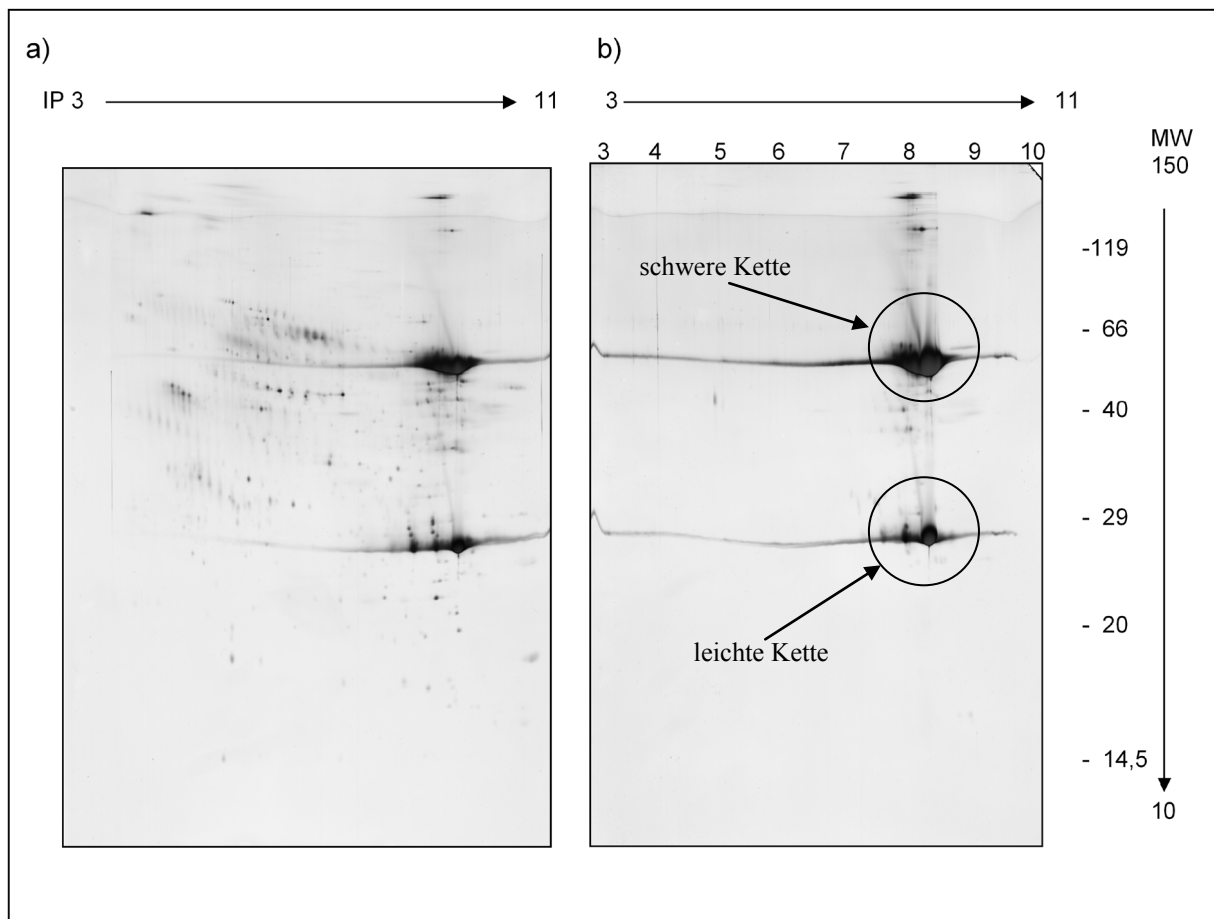


Abbildung 17: Silbergefärbte zweidimensionale Gelelektrophorese des Anti-IL-8-Antikörpers, (a) vor und (b) nach der Aufreinigung mit einer Protein-A-Säule. Die Trennung in leichte und schwere Kette erfolgte aufgrund der reduzierenden Trennbedingungen. Die Proteinverunreinigungen aus dem Nährmedium (fetales Kälberserum) konnten durch die Aufreinigung effektiv entfernt werden.

Neben den Banden der leichten und schweren Kette sind viele weitere Spots zu erkennen. Dies sind Proteine aus dem fetalen Kälberserum, welches als Nährmedium für die Antikörper produzierenden Zellen dient. Diese Verunreinigungen können durch die Aufreinigung entfernt werden (Abbildung 17, rechts) jedoch sind die leichten und schweren Ketten des Antikörpers in mehrere Proteinspots aufgespalten. Dies deutet auf unterschiedliche Modifikationen des Antikörpers hin; dass solche Unterschiede mittels Gelelektrophorese getrennt werden können, ist bereits aus der Literatur bekannt.^[226] Diese Heterogenität führt auch zu einer Verbreiterung der Spots in der Dimension der Molekülmassen. Dass es auch zu Bandenverbreiterungen in der ersten Trenndimension kommt, liegt am Einfluss des isoelektrischen Punktes. Darüber hinaus sind auch noch weitere Banden von schwereren Proteinen zu erkennen. Dabei könnte es sich um den kompletten, nicht reduzierten Antikörper handeln oder auch um teilweise reduzierten Antikörper. Aus dem Gel lässt sich der isoelektrische Punkt des Anti-IL-8-Antikörpers ablesen: 8,5. Damit liegt dieser im Bereich der literaturbekannten isoelektrischen Punkte anderer Antikörper von 8 bis 9.^[227]

MALDI-MS Parameter

Intakte Antikörpermoleküle sind mit ihrem Molekulgewicht von rund 150 kDa vergleichsweise große Proteinmoleküle. Für solche bietet sich zur massenspektrometrischen Analyse die Kombination aus der sanften Ionisierung mittels MALDI und des ToF-Analysators an. Da unterschiedliche Proteine sich in den verschiedenen MALDI-Matrices unterschiedlich gut analysieren lassen, wurde dies zu Beginn untersucht. Dazu wurde der Anti-IL-8-Antikörper jeweils mit einer der drei Matrices (CHCA, DHB und SA) kristallisiert und anschließend mit einem Reflex-III von Bruker (Bremen, Deutschland) gemessen. In Abbildung 18 sind die Spektren der Messungen des Antikörpers in den drei Matrices vergleichend dargestellt. In allen Messungen lassen sich neben dem Peak bei m/z 150.000, was dem einfach geladenen Antikörper entspricht, auch der zweifach geladene Antikörper (m/z 75.000) erkennen.

Die CHCA Matrix ist eindeutig die schlechteste für Antikörpermessungen, da die Signale im m/z -Bereich bis 75.000 sehr intensiv sind, aber die Peaks im höheren m/z -Bereich nur schwach ausgeprägt sind. Damit ist der einfach geladene Antikörper mit 150 kDa schlechter messbar als der zweifach geladene und damit nicht geeignet für MALDI-MS-Messungen. DHB ist als Matrix deutlich günstiger, da der Antikörper als Ganzes besser zu analysieren ist. Die intensivsten und schärfsten Peaks wurden jedoch mit SA als Matrix erhalten.

Aus diesem Grund wurde Sinapinsäure in den folgenden Messungen als Matrix verwendet. Für alle drei Matrices kann gesagt werden, dass die erhaltenen Peaks sehr breit sind, was die Bestimmung der Molekülmasse erschwert.

Zum Vergleich der Messungen des Anti-IL-8-Antikörpers wurde ein weiterer humaner IgG Antikörper mittels MALDI-MS gemessen. Der Vergleich beider Messungen ist in Abbildung 19 zu sehen. Spektren beider Messungen haben ein sehr vergleichbares Peakmuster. Neben den Peaks des einfach geladenen Antikörpers sind auch Peaks des zwei- und dreifach geladenen Antikörpers zu sehen. Aus der Literatur sind Beispiele für MALDI-ToF-Messungen mit besseren Auflösungen bekannt, diese konnten allerdings mit der vorhandenen Instrumentierung nicht reproduziert werden.^[228]

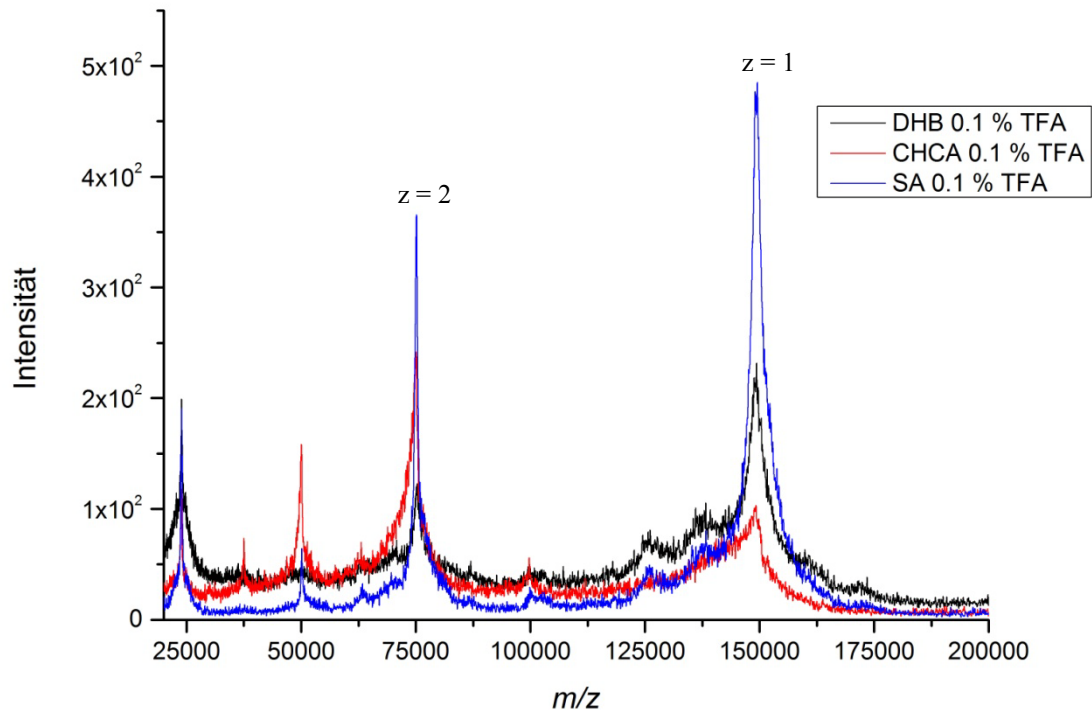


Abbildung 18: Vergleich der MALDI-MS-Messungen des Anti-IL-8-Antikörpers in unterschiedlichen Matrices.

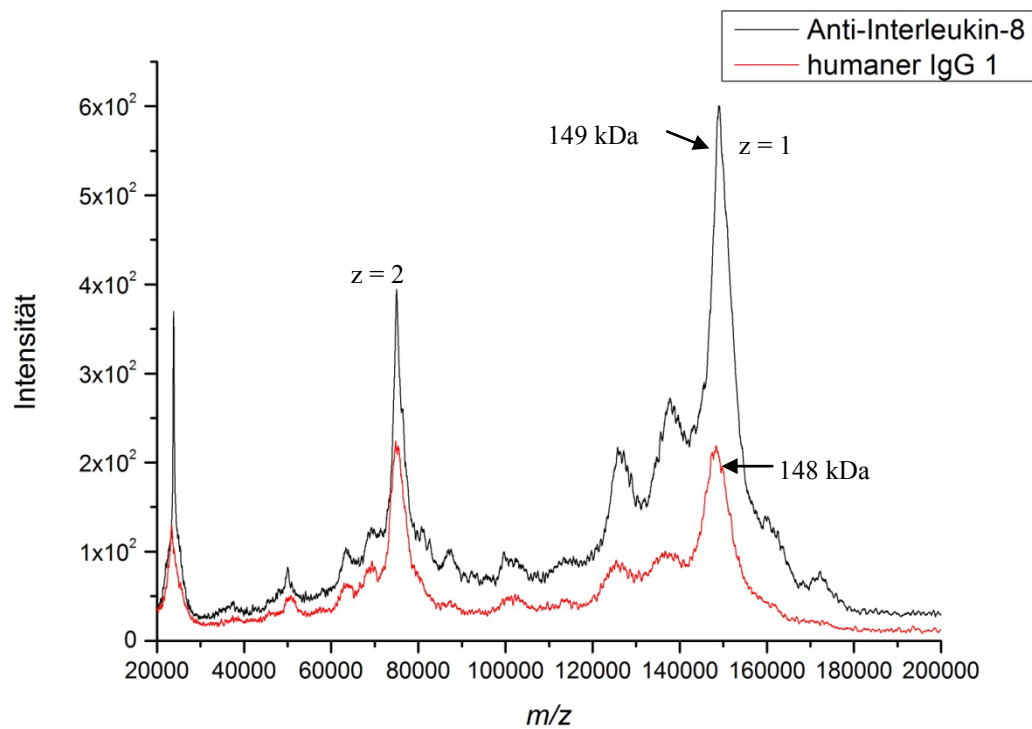


Abbildung 19: MALDI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers und eines humanen IgG, jeweils in einer DHB-Matrix.

ESI-MS Parameter

Der überwiegende Teil der ESI-MS-Messungen wurde an dem High-Mass Q-ToF von MS Vision durchgeführt. Dieses Gerät erlaubt in Kombination mit einer Nano-ESI-Quelle die Analyse von vollständigen Proteinen und großen Fragmenten davon. Zur Ermittlung der optimalen Bedingungen und Messparameter für die Analyse von intakten Antikörpern wurden Voruntersuchungen am Beispiel des Anti-IL-8-Antikörpers vorgenommen. Zu diesen Voruntersuchungen gehören einige Geräteparameter des High-Mass Q-ToF: die Quellentemperatur, der Gasdruck im Quellenbereich, die Cone-, Extractor- und Emitterspannungen sowie die Kollisionsenergie. Durch die Erhöhung der Quellentemperatur von 22 °C auf 80 °C kann die Desolvatisierung der Ionen verbessert werden, so dass die Zahl der Lösungsmitteladdukte, die an die Antikörperionen gebunden sind, verringert wird. Diese nicht kovalenten Komplexe aus Lösungsmittelmolekülen und Proteinionen können bei größeren Molekülen vermehrt beobachtet werden und führen zu einer systematischen Verfälschung der Molmasse. In Abbildung 20 ist der Einfluss der Quellentemperatur auf die ESI-MS-Spektren gezeigt. Bei einer Erhöhung der Quellentemperatur verschieben sich die Signale hin zu kleineren m/z -Werten, was auf eine effektivere Desolvatisierung schließen lässt. Es kann dabei eine Veränderung in der Signalintensität der verschiedenen Ladungszustände beobachtet werden. Allerdings bleibt die Intensität des Totalionenstromes während der Messung konstant (Abbildung 21), was bedeutet, dass es bei erhöhten Temperaturen zu keiner Verschlechterung der Signalintensitäten kommt. Die Signale werden durch die bessere Desolvatisierung sogar schärfer und intensiver. Für die nachfolgenden Messungen wurde eine Temperatur von 30 °C gewählt, um eventuelle labile Komplexe zu schonen und um eventuelle Schwankungen der Raumtemperatur auszugleichen.

Das eingesetzte ESI-MS-Gerät verfügt über die Möglichkeit der Druckerhöhung im Quellenbereich. Dies kann dazu genutzt werden, um mittels Kollisionskühlung die kinetische Energie der Ionen zu verringern und sie somit „abzukühlen“. Das verhindert Fragmentierungen in der Quelle und erhöht gleichzeitig die Fokussierung der Ionen. Mit steigendem Quellendruck wurde die gemessene Signalintensität des Totalionenstromes größer (Abbildung 22). Dies zeigt den deutlichen Vorteil der Fokussierung und der Kühlung der Ionen mittels hoher Gasdrücke. Hohe Drücke führen jedoch zu einer großen Beanspruchung der Turbopumpe und zu starken Ablagerungen im Quellenbereich und im Bereich der Ionenoptik. Diese Ablagerungen entstehen durch die Kombination von hohen Drücken und den angelegten Spannungen. Um diese Belastungen so gering wie möglich zu halten, wurde ein Druck von 20 mbar gewählt.

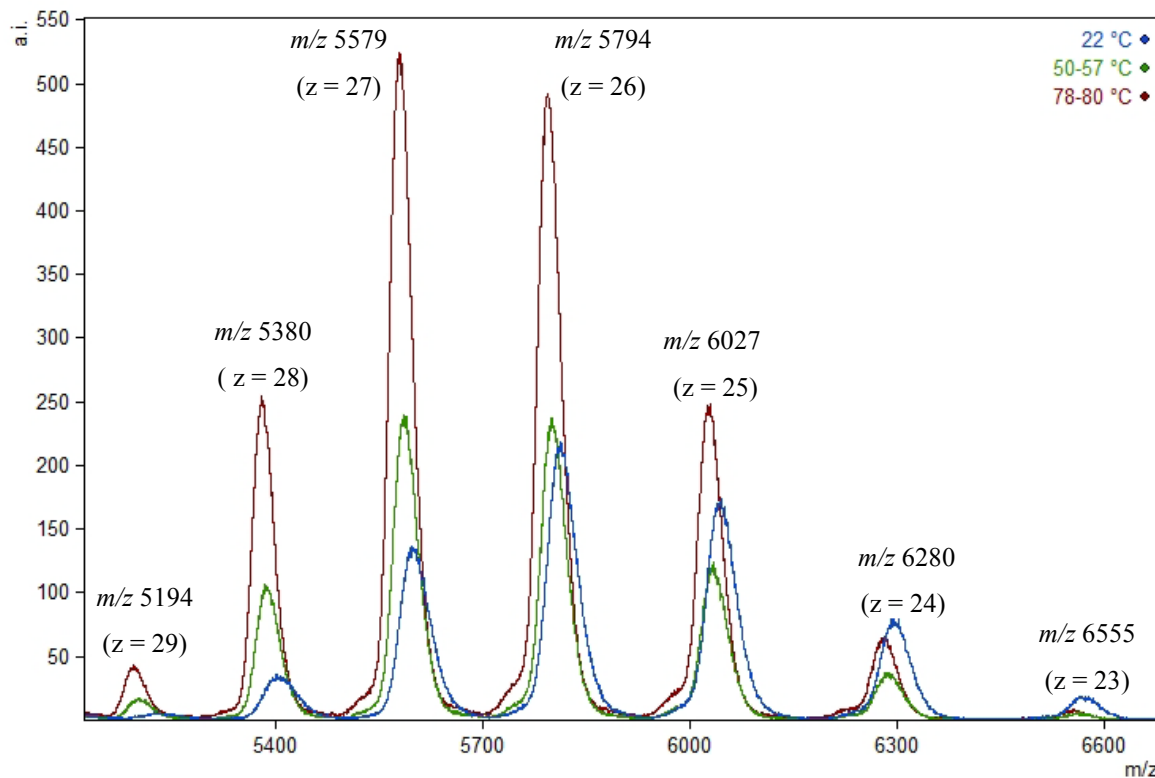


Abbildung 20: Einfluss der Quelltemperatur auf das ESI-MS Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat im Bereich von 22 °C bis 80 °C. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einer effizienteren Desolvatisierung der Analytionen. Die m/z -Werte beziehen sich auf das Spektrum bei 78-80 °C, die Ladungszahlen auf alle, jeweils übereinander liegenden Signale.

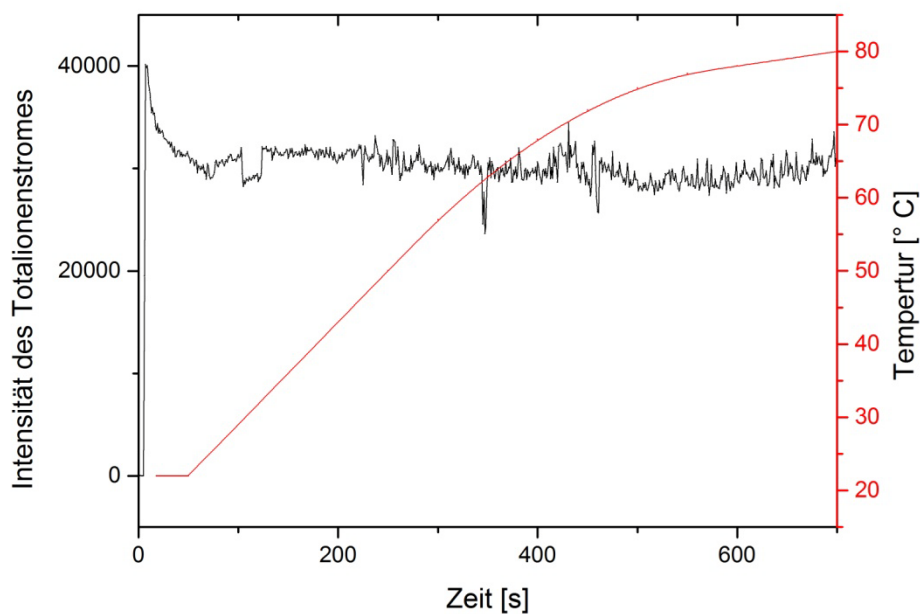


Abbildung 21: Intensität des Totalionenstromes während laufender ESI-MS Messungen des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat, bei gleichzeitiger Erhöhung der Quelltemperatur von 22 °C auf 80 °C.

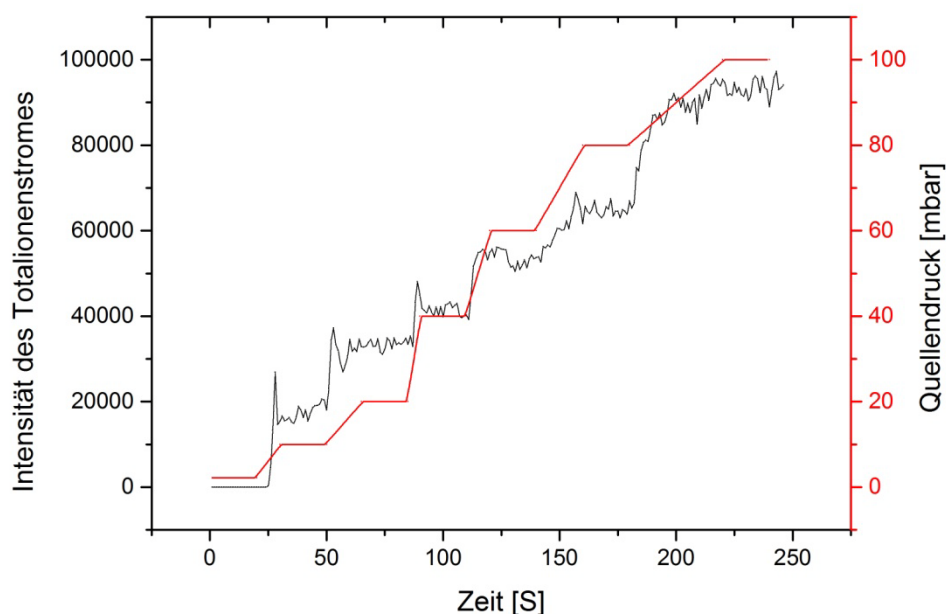


Abbildung 22: Intensität des Totalionenstromes während laufender ESI-MS Messungen des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat, bei gleichzeitiger Erhöhung des Quellendrucks von 2,2 auf 100 mbar.

Als weitere Parameter wurden die Cone-, die Extraktor- und die Emitterspannung variiert. Die Änderung der Emitterspannung hat keinen Einfluss auf die Qualität der Spektren, der Standardwert liegt bei 1 kV. Cone- und Extraktorspannungen wurden zusammen untersucht. Durch eine starke Erhöhung der Spannungen von 20 auf 99 V im Falle der Conespannung und von 2 V auf 100 V bei der Extraktorspannung konnte eine deutliche Verschiebung der Signale hin zu kleineren m/z -Werten beobachtet werden (Abbildung 23). Auch in diesem Fall ist dies auf eine bessere Desolvatisierung durch Verlust von Wasser bzw. Lösungsmittelmoleküle zurückzuführen.

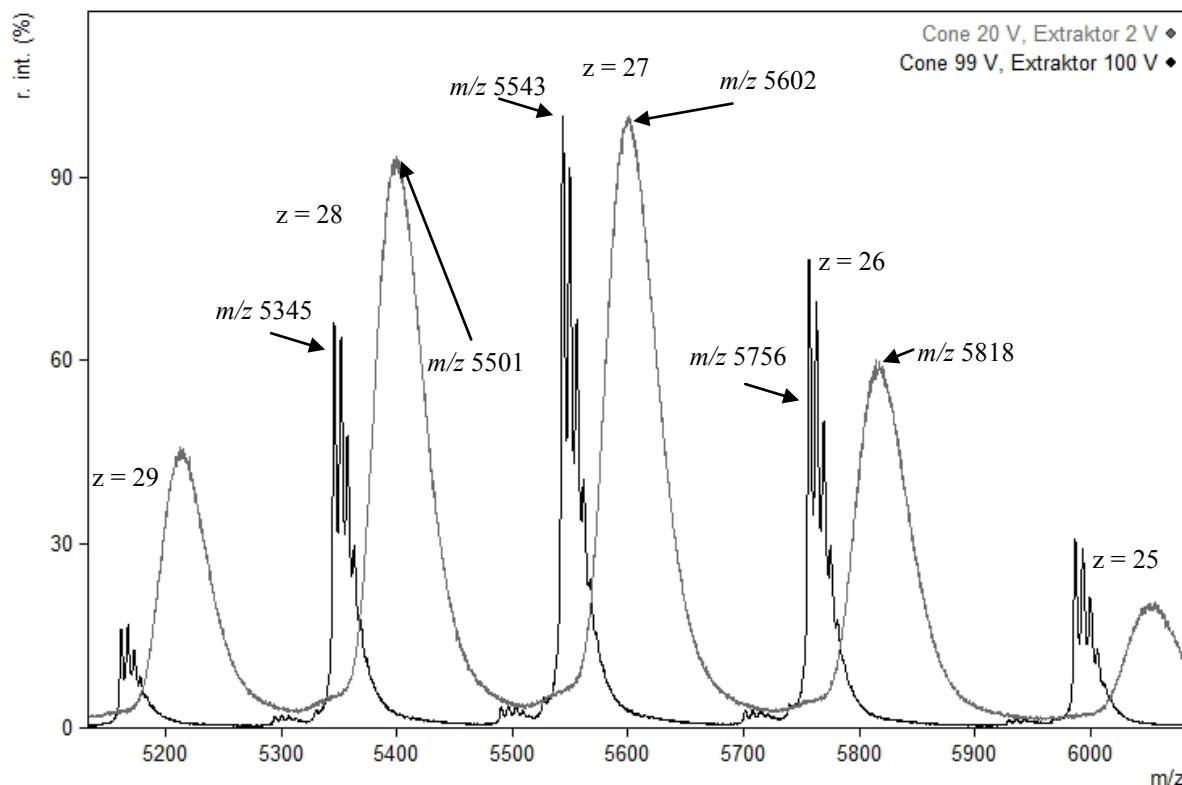


Abbildung 23: Einfluss der Änderung der Cone- und Extraktorspannungen auf das ESI-MS Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetatpuffer.

Des Weiteren ist eine Aufspaltung der einzelnen Signale zu erkennen. Durch die bessere Desolvatisierung sind nun vorher überlagerte Signale zu erkennen, die auf unterschiedliche Modifizierungen hindeuten und somit eine gewisse Heterogenität erzeugen, welche bereits bei der Gelelektrophorese zu erkennen war. Diese Heterogenitäten waren Gegenstand späterer genauerer Untersuchungen. Trotz des Vorteils, die Heterogenitäten direkt messen zu können, wurden die erhöhten Spannungen nicht gewählt, da sich unter diesen Bedingungen nicht alle Analysen durchführen ließen. Zur besseren Vergleichbarkeit aller Messungen wurden daher für die Messung intakter Antikörper 20 V als Conespannung und 2 V als Extraktorspannung als Parameter gewählt.

Neben den optimalen Quellenparametern spielt auch die richtige Wahl der Kollisionsenergie eine entscheidende Rolle. Der Hersteller des High-Mass Q-ToF hat die Transmission der Ionen durch die Kollisionszelle auf 10 eV optimiert. Jedoch bietet diese eine sehr große Variationsbreite der zu wählenden Spannung. Zur systematischen Untersuchung des Einflusses der Kollisionsenergie auf die Antikörperionen wurde deren schrittweise Erhöhung von 10 eV bis auf 200 eV durchgeführt. In Abbildung 24 sind die ESI-MS-Spektren bei den Energien von 10, 50 und 100 eV dargestellt. Es kommt zu einer Verschiebung der Signale hin

zu geringeren m/z . Oberhalb von 100 eV blieben die Peaks konstant bei den gleichen m/z -Werten, wobei sich aber die Signalintensität verringerte.

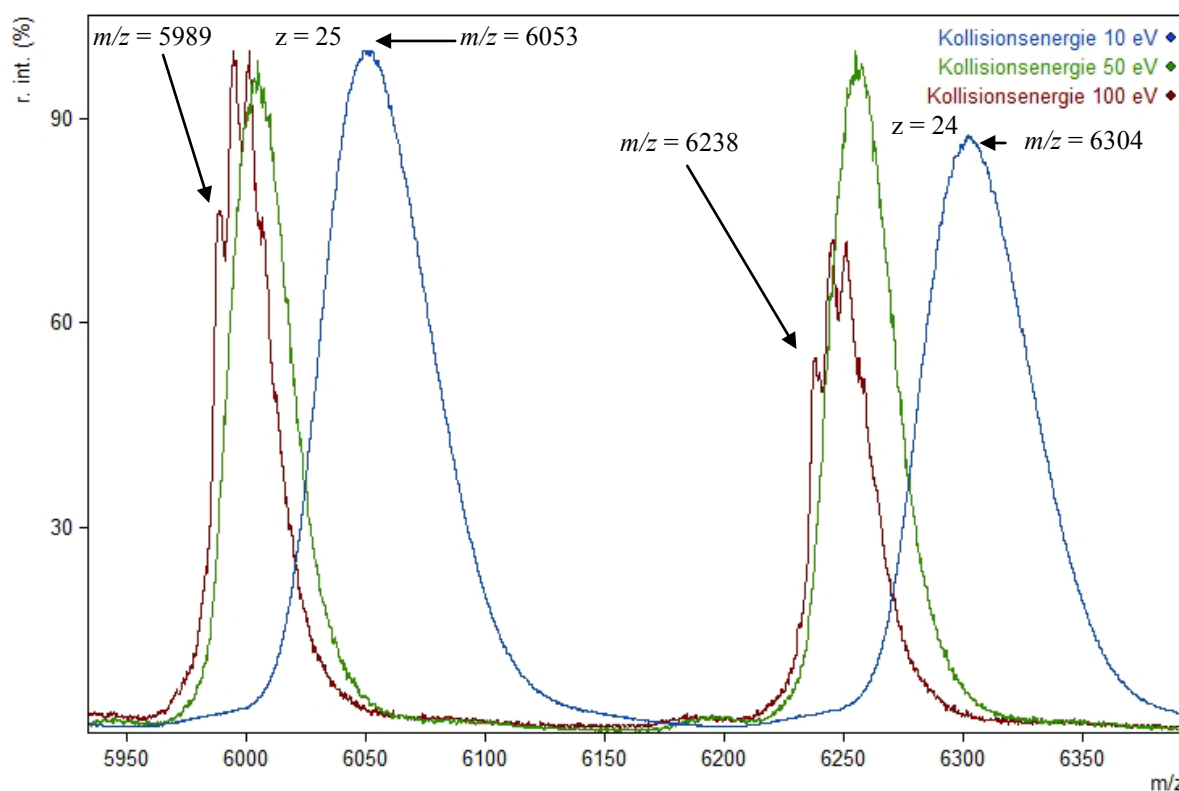


Abbildung 24: ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers bei unterschiedlichen Kollisionsenergien (blau 10 eV, grün 50 eV und rot 100 eV).

Diese Verschiebung zu kleineren m/z -Werten und damit zu geringeren Molekülmassen lässt sich durch eine fortschreitende Desolvatisierung des Antikörpers durch Stöße mit dem Kollisionsgas (Argon) erklären. Dies ist der gleiche Effekt, der auch schon bei den erhöhten Cone- und Extraktionsenergien beobachtet wurde. Eine andere prinzipiell mögliche Erklärung der Veränderung in den MS-Spektren wäre die Fragmentierung des Antikörpers. Dies würde jedoch zu deutlich anderen Massenspektren führen. Es müssten neben den Molekülonen auch Fragmentionen zu beobachten sein. Dies war allerdings nicht der Fall. Auch sind die Änderungen in der Molekülmasse zu klein, als dass dies ein Verlust von Ketten des Antikörpers sein könnte. Die Desolvatisierung ist die schlüssigste Erklärung und da es zu keiner Verschiebung der Peaks oberhalb von 100 eV kommt, kann davon ausgegangen werden, dass der Antikörper bei diesen Werten vollständig desolvatisiert war. Hieraus ergibt sich eine Molekülmasse von 149.482 ± 61 Da.

Neben den gerätespezifischen Parametern ist die Zusammensetzung der Analysenlösung von entscheidender Bedeutung, insbesondere der pH-Wert und der Anteil flüchtiger Lösungsmittel

sind wichtig. Die Ionisierung der Analytionen erfolgt besonders gut, wenn die Konzentration der Ladungsträger, in den meisten Fällen Protonen, hoch ist und diese gut auf den Analyten übertragen werden können. In der Proteinanalytik werden häufig organische Säuren wie z.B. Ameisensäure (FA) oder Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt. Neben diesen beiden Säuren wurden weiterhin Essigsäure (AA) und organische Puffer wie Ammoniumacetat-, Ammoniumformiat- und Triethylammoniumacetatlösungen für die Analyse des Anti-IL-8-Antikörpers eingesetzt. Das Ziel dieser Versuche war, ein System zu finden, mit dem eine ausreichende Zahl an Signalen vorhanden ist, damit eine Berechnung der Massen möglich wird. Darüber hinaus sollten die Signale basisliniengetrennt sein und möglichst eine geringe Peakbreite aufweisen. Die Verwendung von organischen Säuren führt zu hohen Ladungszahlen im Antikörpermolekül (Abbildung 25). Die Signale weisen bei hohen Ladungszahlen eine geringe Halbwertsbreite auf, allerdings sind diese meist nicht basisliniengetrennt. Ganz allgemein lassen sich für jede Säure zwei Ladungsverteilungen erkennen, die erste hat bei allen drei ihre Mitte bei etwa m/z 3800. Während die Verteilungen bei AA und FA sehr ähnlich sind, ist bei TFA die zweite Verteilung sehr deutlich zu höheren m/z -Werten verschoben (Abbildung 72 und Abbildung 73, Anhang). Bei jeder der Säuren erstrecken sich die Ladungsserien durchgehend über beide Ladungsverteilungen, sodass unterschiedliche Konformationen des Antikörpers eine Erklärung für das Vorhandensein zweier Ladungsserien sein könnte. Das Auftreten unterschiedlicher Ladungsserien ist aus der Literatur bekannt und wird neben dem pH-Wert auch dem pK_s -Wert der Säure zugeschrieben.^[229, 230] Diese Effekte können somit die gefundenen Unterschiede gut erklären, da FA (pK_s 3,77; pH 2,7) und AA (pK_s 4,76; pH 3,2) sich in ihren Werten ähneln, während sich TFA (pK_s 0,23; pH 2,0) von diesen unterscheidet.

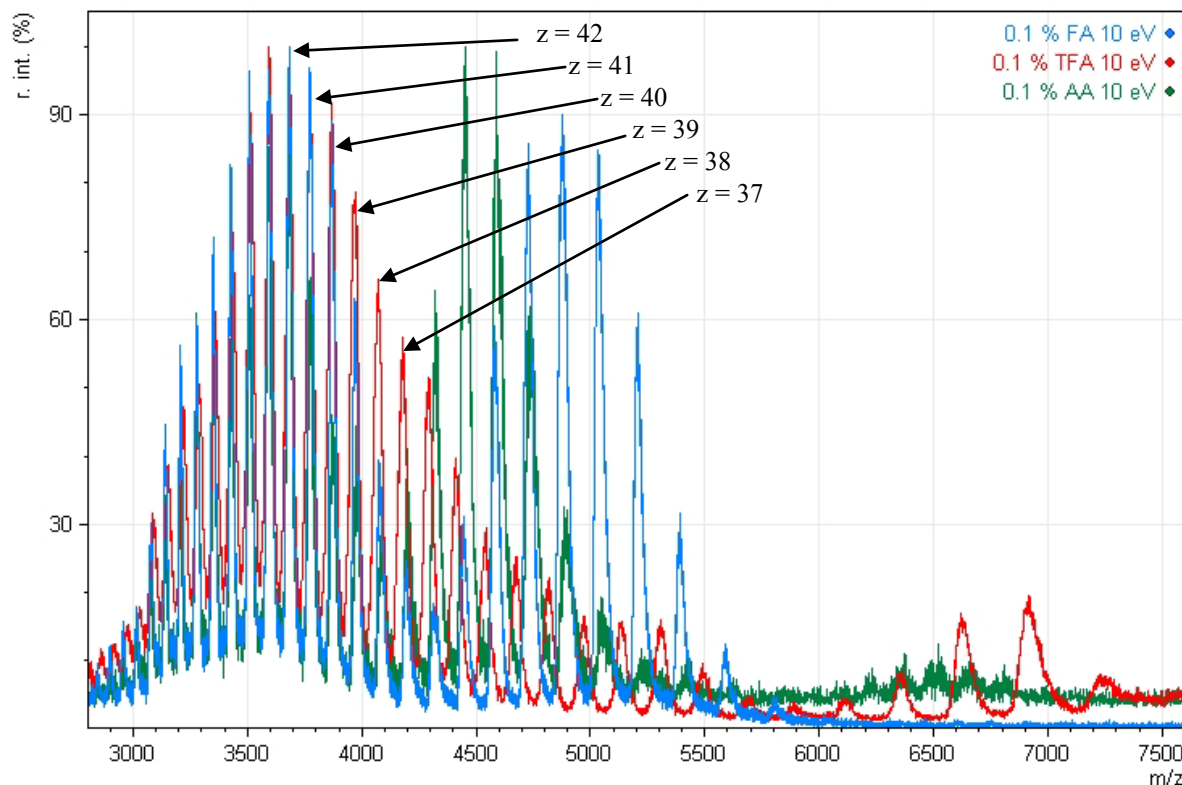


Abbildung 25: Vergleich von ESI-MS-Spektren von Anti-IL-8 in AA (grün), TFA (rot) und FA (blau). Es zeigen sich bei Verwendung der organischen Säuren hohe Ladungszustände und intensive Signale mit geringer Halbwertsbreite.

Die pH-Werte der Lösungen der organischen Säuren lagen zwischen 2 und 3,2, die untersuchten ammoniumhaltigen Puffer hatten dagegen einen pH-Wert von 7. Dies liegt deutlich näher an nativen Bedingungen und ist dadurch vorteilhafter für die Analyse von Antikörpern im Hinblick auf ihre Funktionsfähigkeit. In Abbildung 26 sind ESI-MS-Spektren der Antikörpermessungen gezeigt, die mit den Pufferlösungen erzeugt werden konnten. Es gibt für Ammoniumacetat und -formiat sehr ähnliche Signalmuster und eine Ladungsverteilung mit den Ladungen 21 bis 27 um etwa m/z 6000. Für das Triethylammoniumacetat liegt die Signalverteilung um m/z 9000 und es gibt nur vier Ladungszustände von 19 bis 22. Bei jedem Puffer findet sich neben der intensiven Signalserie auch noch jeweils eine weitere Signalserie bei wesentlich höheren m/z -Werten.

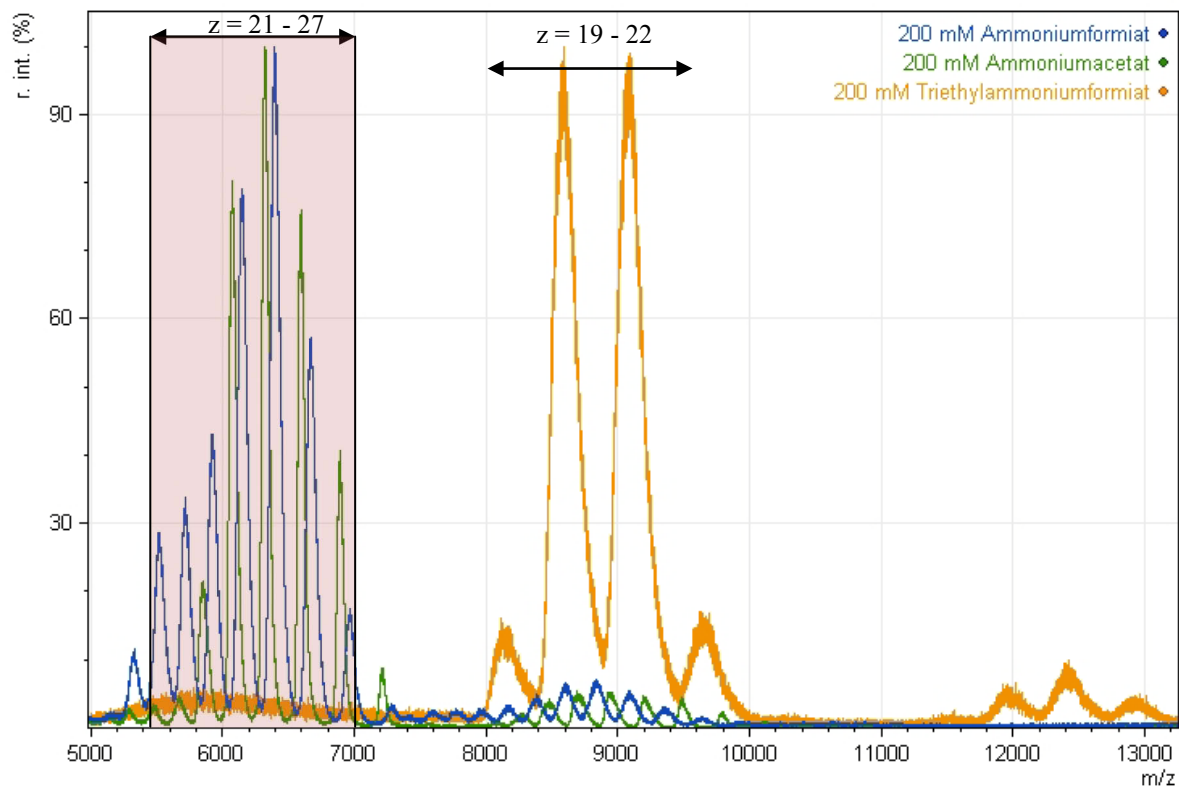


Abbildung 26: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-Interleukin-8 Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat (grün), 200 mM Triethylammoniumacetat (gelb) und 200 mM Ammoniumformiat (blau).

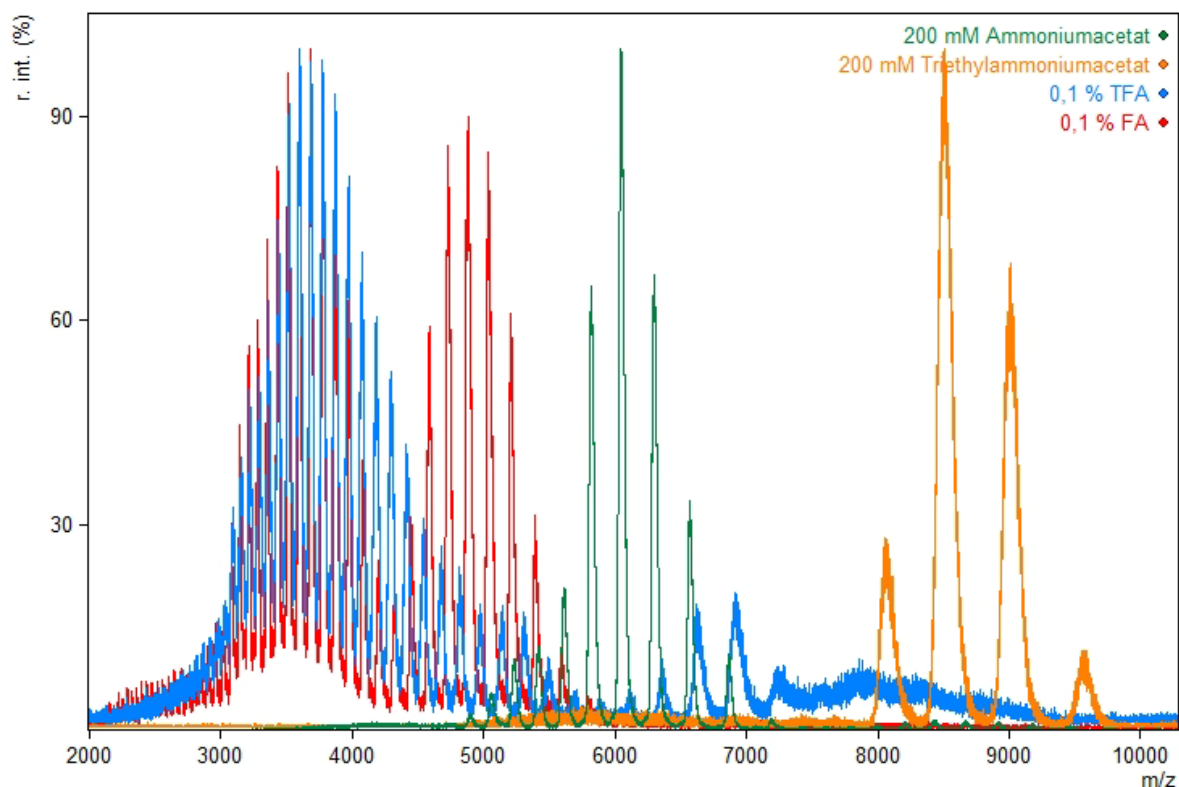


Abbildung 27: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers in den vier verschiedenen Puffern (grün: Ammoniumacetat; gelb: Triethylammoniumacetat; blau: TFA und rot: FA). Mit organischen Säuren in der Messlösung können höhere Ladungszustände erreicht werden, wobei die Signale dann schlechter unterschieden werden können.

Für das Ammoniumacetat und -formiat liegt diese um m/z 8800 und beim Triethylammoniumacetat bei m/z 12400. Die Signale der Messungen in Ammoniumacetat und -formiat haben eine deutlich geringere Halbwertsbreite, als beim Triethylammoniumacetat. Weiterhin ist zwar keine Basislinientrennung zu sehen, aber beim Triethylammoniumacetat sind die Signale am schlechtesten getrennt. Darüber hinaus sind beim Triethylammoniumacetat durchschnittlich nur vier Ladungszustände auswertbar, was für eine Berechnung der Molekülmasse ungünstig ist, da somit eventuelle Schwankungen nur schlecht ausgeglichen werden können. Im direkten Vergleich der Messungen in den organischen Säuren (FA und TFA) und dem Ammoniumacetat bzw. Triethylammoniumacetat zeigen sich sehr deutliche Unterschiede in den Signalmustern (Abbildung 27). Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es durch die organischen Säuren zu einer Denaturierung und somit zu einer Entfaltung des Antikörpers kommt. Dieses Verhalten ist von Proteinen bekannt.^[103, 104, 231] Um zu überprüfen, ob die Entfaltung des Antikörpers durch die organischen Säuren oder durch die vorherrschenden sauren pH-Werte erzeugt wird, wurde der Antikörper in 200 mM Ammoniumacetat gemessen und der pH-Wert durch die Zugabe von AA schrittweise von 7,0 auf 3,5 gesenkt (Abbildung 28). Dabei kommt es zu einer geringen Änderung der Ladungszustände und zu einer geringfügigen Verschiebung der m/z -Werte. Zum Vergleich wurde der Antikörper in AA gemessen und der pH-Wert durch die Zugabe von Ammoniaklösung von 3,2 auf 4 erhöht (Abbildung 29). Hier ist ein deutlicher Unterschied zwischen pH 3,2 und 4 zu sehen. Dies bedeutet, dass es zum Übergang vom entfalteten in den gefalteten Zustand des Antikörpers kommt. Weiterhin bedeutet dies, dass der Prozess des Faltungs- und Entfaltungsprozesses nicht irreversibel ist, da der Antikörper aus seiner entfalteten (hoch geladenen) Struktur in die gefaltete (weniger hoch geladene) Struktur übergeht.^[232] Auch ist sehr deutlich, dass die beobachtete Faltung bzw. Entfaltung vom pH-Wert abhängig ist und somit die Acidität z.B. von Ammoniumacetat (pH 7) nicht ausreicht. Damit konnten die literaturbekannten Beobachtungen der Entfaltung von Proteinen für diesen Antikörper bestätigt werden.^[103] Da die Untersuchungen im nativen Zustand im späteren Verlauf der Untersuchungen vorteilhaft sind und darüber hinaus Massenberechnungen des Anti-IL-8-Antikörpers auch mit der geringeren Anzahl an Ladungszuständen möglich sind, wurde der Ammoniumacetatpuffer für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt.

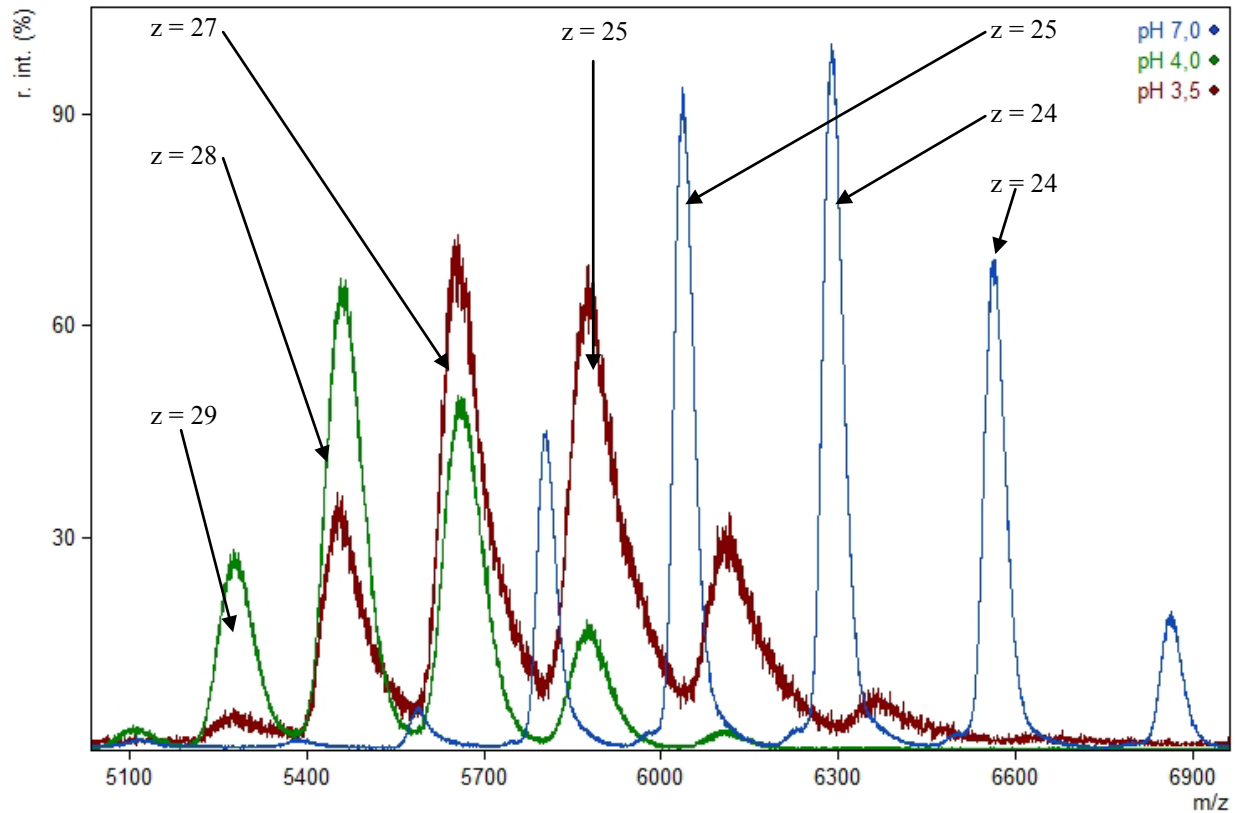


Abbildung 28: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8 Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat bei verschiedenen pH-Werten. Zur Messung wurde der pH-Wert schrittweise von 7,0 (blau), pH 4,0 (grün) und pH 3,5 (rot) verändert.

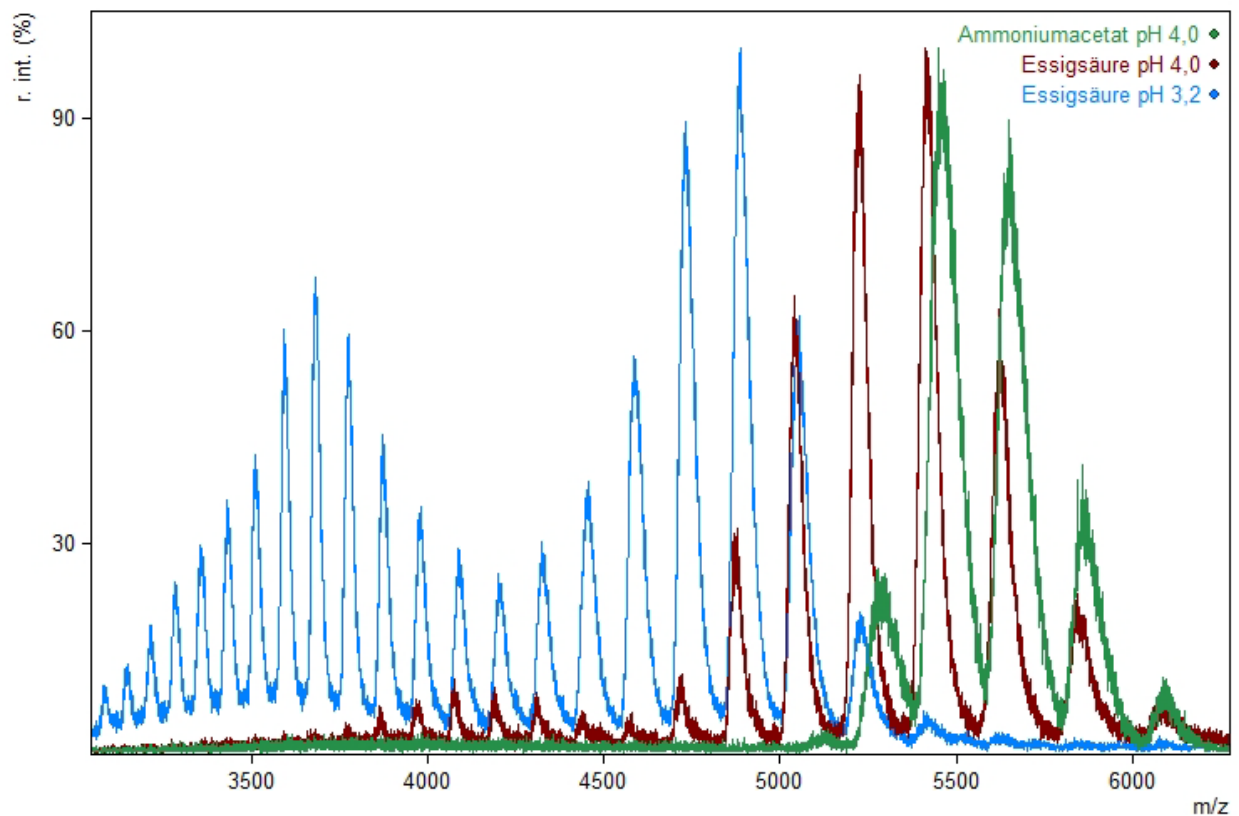


Abbildung 29: ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8 Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat (grün, pH 4) und zum Vergleich in Essigsäure. Zur Messung wurde der pH-Wert der AA-Lösungen von 3,2 (blau) auf 4 (rot) erhöht.

5.1.2 Untersuchungen zur Antikörperstruktur mit ESI-MS

Bestimmung der Molekülmasse des Anti-Interleukin-8-Antikörpers

Die Bestimmung der Molekülmasse von Antikörpern ist ein wichtiger Bestandteil in der Charakterisierung, da diese Hinweise auf Modifikationen liefern können.

Im vorangegangenen Kapitel wurden bereits die Effekte der Erhöhung der Kollisionsenergie gezeigt. Mit steigender Kollisionsenergie kommt es zu einer verstärkten Desolvatisierung der Antikörperionen und damit zu einer Verschiebung der Signale zu niedrigeren m/z -Werten (Abbildung 24). Ausgehend von der systematischen Erhöhung der Kollisionsenergie von 10 auf 140 eV in 10 eV Schritten werden bei jeder Energie die Molekülmassen berechnet. Diese Massen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Errechnete Molekülmasse des Anti-IL-8 Antikörpers bei verschiedenen Kollisionsenergien mit den jeweiligen Standardabweichungen (n = 7 für 10 bis 100 eV; n = 6 für 110 bis 140 eV).

Kollisionsenergie in eV	Masse in Da	Standardabweichung in Da (n = 7 [10 - 100 eV], n = 6 110 - 140 eV)
10	150.504	52
20	150.356	65
30	150.183	55
40	150.073	110
50	149.866	83
60	149.728	127
70	149.658	146
80	149.558	94
90	149.511	68
100	149.482	61
110	149.471	52
120	149.532	135
130	149.570	300
140	149.890	220

Es ist ganz klar zu erkennen, dass mit steigender Kollisionsenergie die errechnete Molekülmasse abnimmt. Ab einer Kollisionsenergie von 120 eV nimmt die errechnete

Molekülmasse scheinbar wieder zu. Dieser Effekt ist darauf zurückzuführen, dass die Auflösung der Signale schlechter und damit die Bestimmung der Peakmaxima schwieriger wird. Eine andere Methode zur Errechnung der Molekülmasse nutzt die Halbwertsbreite eines Signals, diese wird gegen den jeweiligen m/z -Wert aufgetragen (Abbildung 74, Anhang).^[233] Auch hier kommt es durch die Erhöhung der Kollisionsenergie zu Verschiebungen der Signale hin zu niedrigeren m/z -Werten und darüber hinaus wird die Halbwertsbreite der Signale kleiner. Die Berechnung über die Halbwertsbreiten nimmt an, dass an dem Punkt, an dem die Halbwertsbreite null wird, sich die niedrigste Masse des untersuchten Moleküls befindet (Tabelle 17, Anhang). Dies ist allerdings selbst bei monoisotopischen Analyten nicht möglich und die Isotopenverteilung eines Moleküls in der Größe eines Antikörpers wäre um einiges größer. Diese Art der Berechnung berücksichtigt ebenfalls nicht, inwieweit der Antikörper ohne Lösungsmittelmoleküle noch nativ ist.

Aus diesem Grund wurde die erste Methode zur Berechnung der Masse angewendet und es wurde für den Anti-IL-8-Antikörper eine Molekülmasse von 149.471 ± 51 Da bestimmt. Die gewählten ESI-MS-Parameter waren: 20 mbar Quelledruck, 30 °C Quelltemperatur, 1 kV Quellenspannung, 20 V Conespannung, 2 V Extraktorspannung, 4 eV Transferenergie (ion energy) und 10 eV Kollisionsenergie. Ein direkter Vergleich mit Literaturwerten ist nicht möglich, da diese für den Anti-IL-8-Antikörper nicht vorhanden sind. Da jeder Antikörper auf Grund der Heterogenität der Modifizierungen und variablen Domänen eine andere Masse aufweist, ist somit auch nur ein begrenzter Vergleich mit anderen Antikörpern möglich. Allerdings zeigen diese Vergleiche, dass die Größenordnungen der bestimmten Masse sehr gut passt.^[110] Viele Beispiele, die in der Literatur bekannt sind, befassen sich allerdings meist mit deglykosylierten Antikörpern.^[202] Nur in einigen wenigen Arbeiten wurden auch intakte, nicht deglykosylierte Antikörper IgG1-Antikörper untersucht. Die hier bestimmten Molekülmassen reichen von 147.339 ± 101 Da über 147.918 Da und 148.080,3 Da bis hin zu $149.589,5 \pm 1,5$ Da. Die jeweils angegebenen Genauigkeiten entsprechen denen aus der Literatur.^[182, 234-236] Diese Beispiele zeigen deutliche Variationen der Molekülmassen, die selbst innerhalb einer Antikörperklasse existieren, sodass die berechnete Molekülmasse von 149.471 ± 51 Da für den Anti-IL-8-Antikörper stimmig erscheint.

Mit Hilfe von mathematischen Methoden (MaxEnt, Maximum Entropie) konnte aus dem ESI-MS-Spektrum, in 33 Iterationen, ein dekonvoliertes konstruiert werden.^[182, 237] Dieses stellt das Spektrum des ungeladenen Antikörpers da (Abbildung 30). Die mit dieser Methode errechnete Masse des Antikörpers liegt mit 149486 Da sehr nah an der selbst errechneten. Es können in dem dekonvolierten Spektrum auch die unterschiedlichen Modifikationen gefunden

werden, wobei sich die Massenunterschiede zwischen 150 und 162 Da bewegen, dies ist vergleichbar mit Messungen aus der Literatur.^[234, 235] Zur Kontrolle des berechneten Spektrums wurde auch ein ESI-MS-Spektrum mit den ursprünglichen Ladungen modelliert, um zu vergleichen, ob das Ergebnis stimmig ist. Der Vergleich beider Spektren (Abbildung 75, Anhang) zeigt eine sehr große Übereinstimmung, sodass das dekonvolvierte Spektrum korrekt ist.

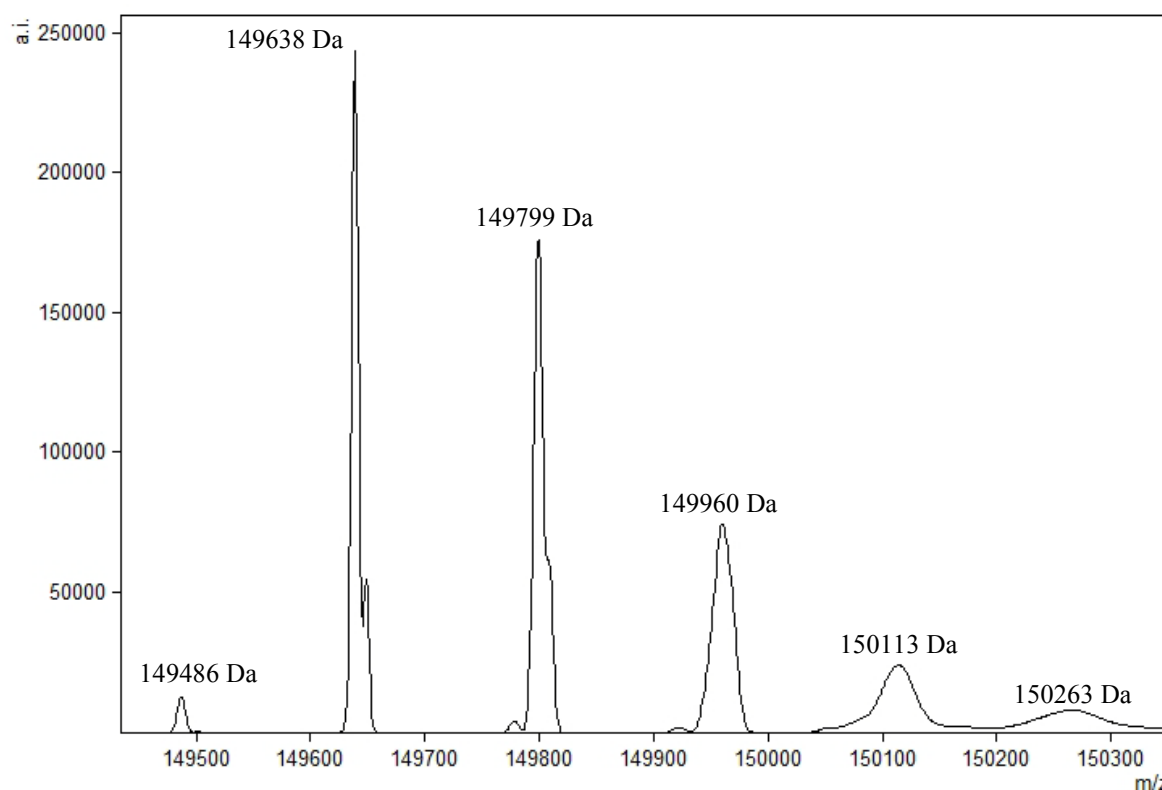


Abbildung 30: Dekonvolviertes Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers.

Oligomerbildung des Anti-IL-8-Antikörpers

Wie bereits in der ESI-MS-Analyse des Anti-IL-8-Antikörpers erwähnt wurde (Abbildung 26), zeigte sich in den ammoniumhaltigen Puffern eine zweite Ladungsserie. Diese hat die doppelte Masse des Antikörpers und ist somit ein Dimer. Durch eine Verringerung der Kollisionsenergie von 10 eV auf 0,5 eV konnte dieser Effekt noch gesteigert werden. Abbildung 31 zeigt, dass neben dem Monomer und Dimer auch das Trimer detektierbar war. Die Signalintensitäten der Oligomere sind bei der Verwendung des Triethylammoniumacetatpuffers deutlich höher als bei Ammoniumacetatpuffer. Wie bereits zuvor gezeigt werden konnte, werden bei der Ionisierung im Triethylammoniumacetatpuffer deutlich weniger Ladungen auf das Antikörpermolekül übertragen (Abbildung 26). Der daraus resultierende

geringere Ladungszustand scheint schonend genug zu sein, damit nicht kovalente Komplexe nicht dissoziieren. Ein Vergleichen mit Messungen in organischen Säuren unter gleichen Geräteparametern (Kollisionsenergie 0,5 eV) zeigt klar, dass es nicht möglich ist, bei höheren Ladungszuständen nicht kovalente Komplexe zu detektieren (Abbildung 32).

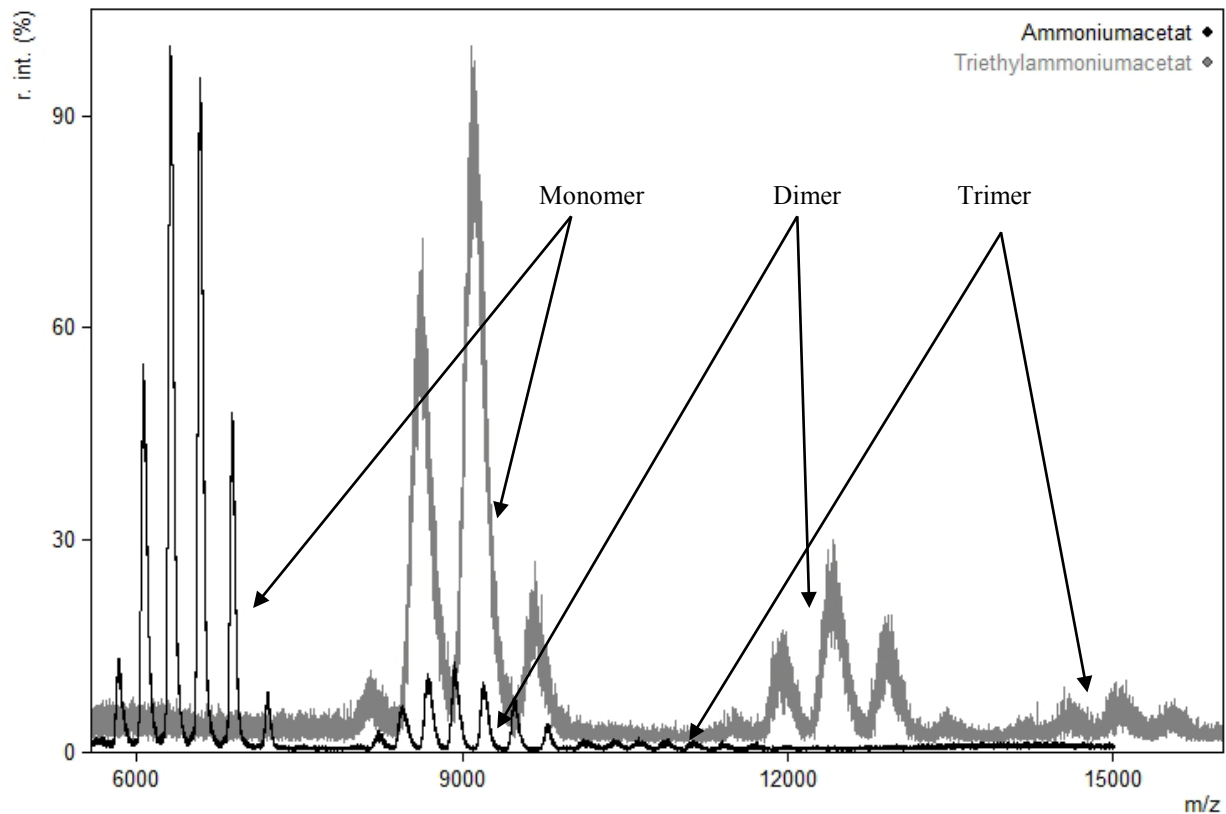


Abbildung 31: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8 in 200 mM Ammoniumacetat (schwarz) und 200 mM Triethylammoniumacetat (grau) bei erniedrigter Kollisionsenergie von jeweils 0,5 eV.

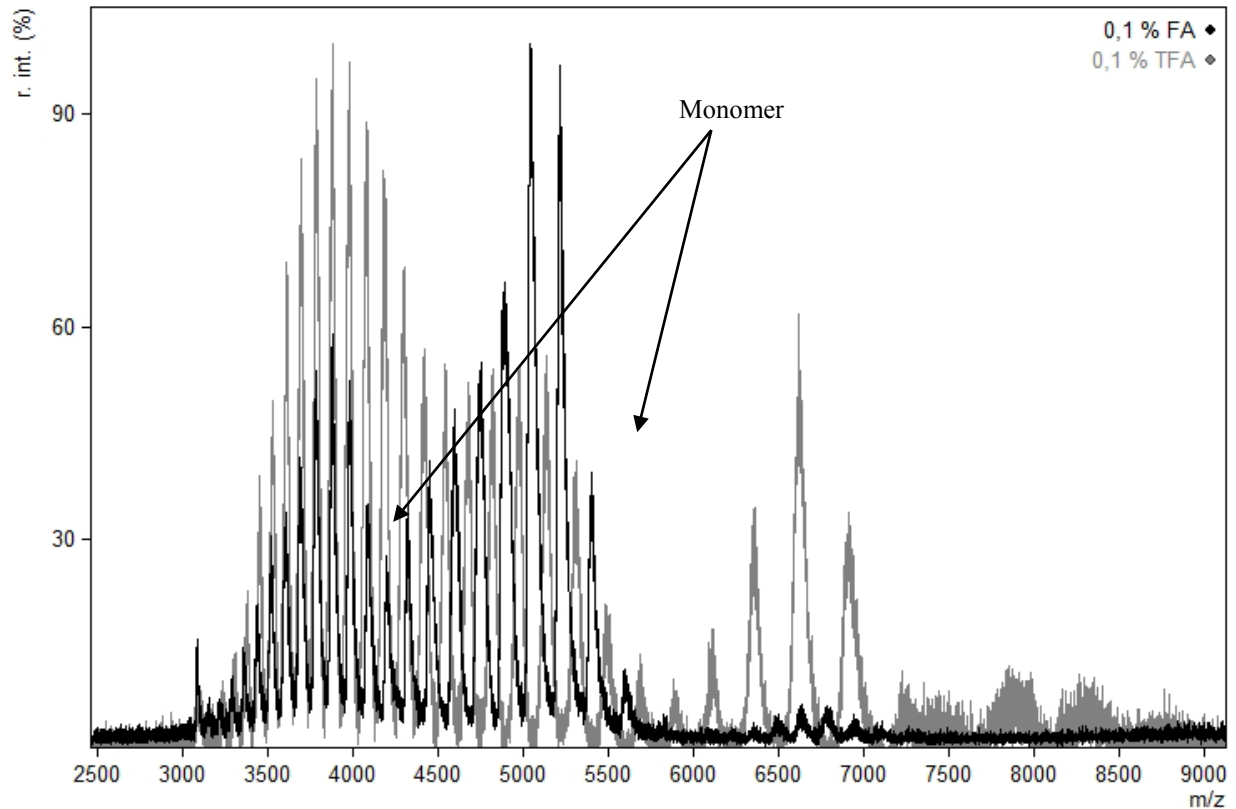


Abbildung 32: ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers in 0,1 % TFA (grau) und 0,1 % FA (schwarz) bei einer Kollisionsenergie von 0,5 eV. Bei den hohen Ladungszuständen bleiben keine Oligomere erhalten.

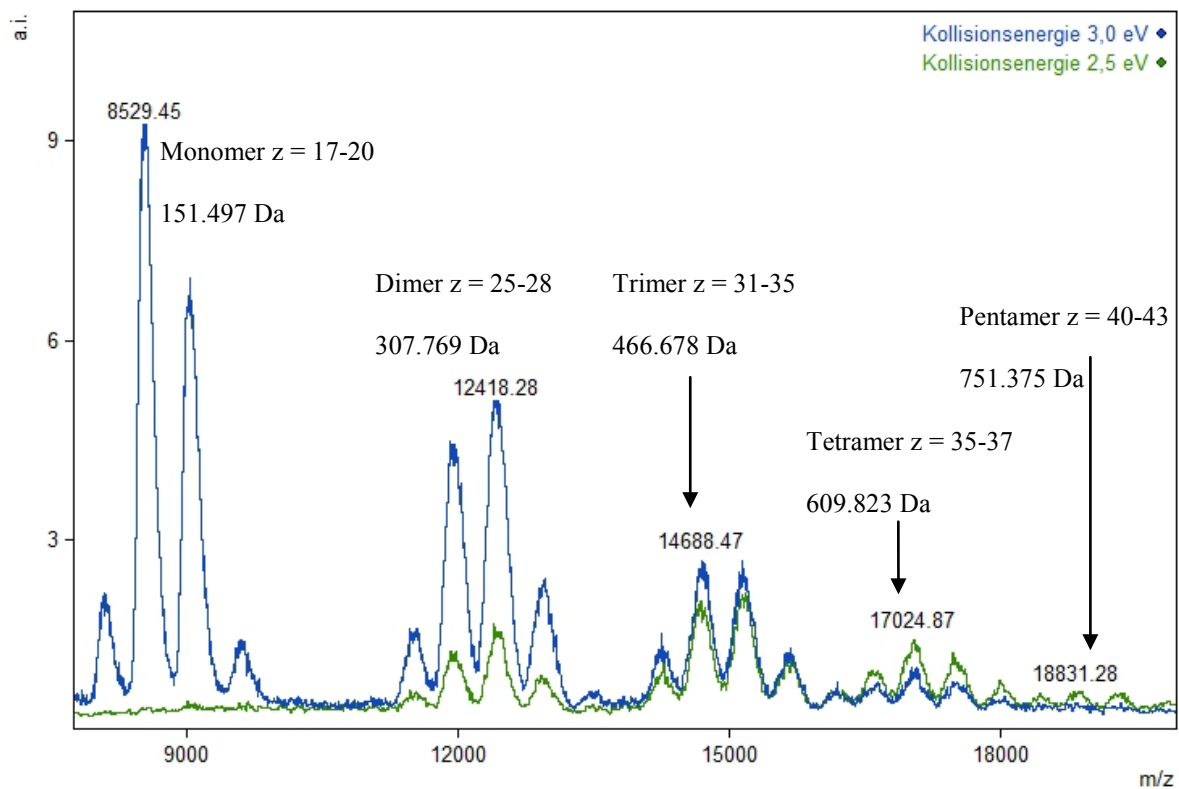


Abbildung 33: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Triethylammoniumacetat, Verringerung der Kollisionsenergie von 3 auf 2,5 eV. Neben den bereits gezeigten Mono-, Di- und Trimeren konnten auch das Tetra- und Pentamer detektiert werden.

In einer weiteren Messung konnten durch einen ungewöhnlich hohen Quellendruck von 100 mbar und geringere Kollisionsenergien von 2,5 bis 3 eV auch Tetra- und Pentamere detektiert werden (Abbildung 33). Ein Vergleich mit der Literatur zeigt, dass Pentamere von IgG-Antikörpern bekannt sind, eine Bestimmung der Molekülmassen ist allerdings nur bis zu Tetrameren bekannt.^[238] Für diesen Antikörper aus der Literatur wurden 147.339 ± 101 Da für das Monomer, für das Dimer 294.709 ± 93 Da, 441.950 ± 313 Da für das Trimer und für das Tetramer 589.745 ± 228 Da als Molekülmassen bestimmt, diese sind somit gut vergleichbar mit den ermittelten Massen des Anti-IL-8-Antikörper Monomers und dessen Oligomere.^[182] Das Fazit dieser Untersuchungen ist die eindeutige Tendenz des Antikörpers, bei steigender Anzahl an Ladungen im Antikörpermolekül weniger Oligomere zu bilden. Des Weiteren sind die Dimere gegenüber den höheren Oligomeren deutlich stabiler und lassen sich auch bei etwas höheren Ladungszuständen noch detektieren.

Aus diesen Untersuchungen ergibt sich die Frage, wie es zur Bildung dieser Oligomere kommt. Bekannt ist, dass einige Antikörper eine sehr starke natürliche Tendenz zur Oligomerbildung haben, während dies bei anderen nicht so stark der Fall ist.^[239] Um zu überprüfen, ob der Anti-IL-8-Antikörper bereits in der Lagerlösung (PBS Puffer) als Oligomer vorliegt, wurden damit verschiedene Messungen durchgeführt. Dazu wurde der Antikörper mittels Größenausschlusschromatographie (SEC) in Kopplung mit einem ICP-MS verwendet und das Signal ^{32}S gemessen. Bei diesen Messungen (Abbildung nicht gezeigt) wurden keine Hinweise auf Oligomere gefunden.

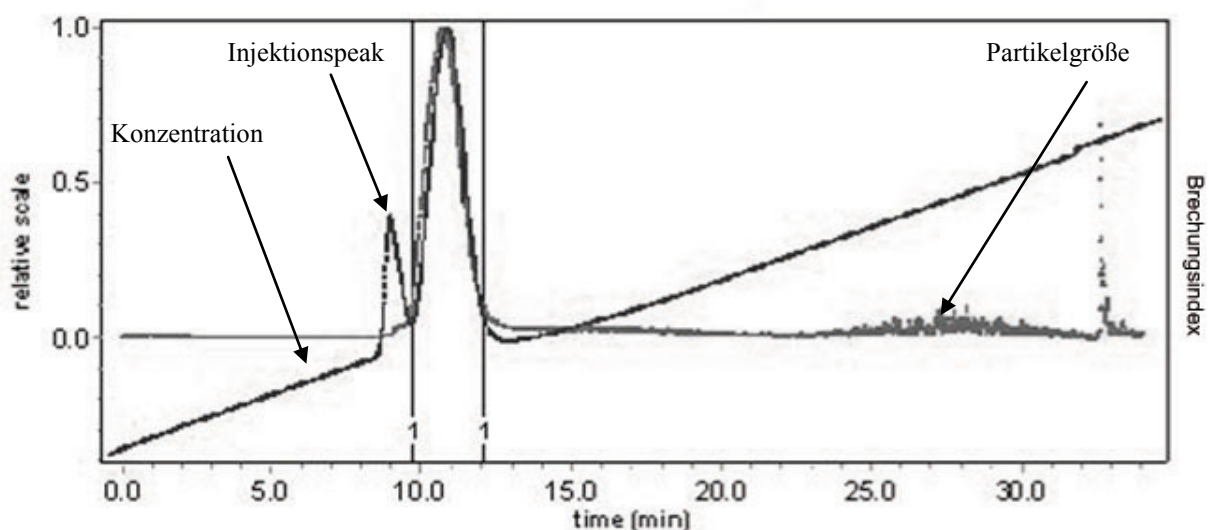


Abbildung 34: Fraktogramm des Anti-Interleukin-8-Antikörpers, zeitaufgelöste Messung des Brechungsindex (grau) und der Lichtstreuung (schwarz).

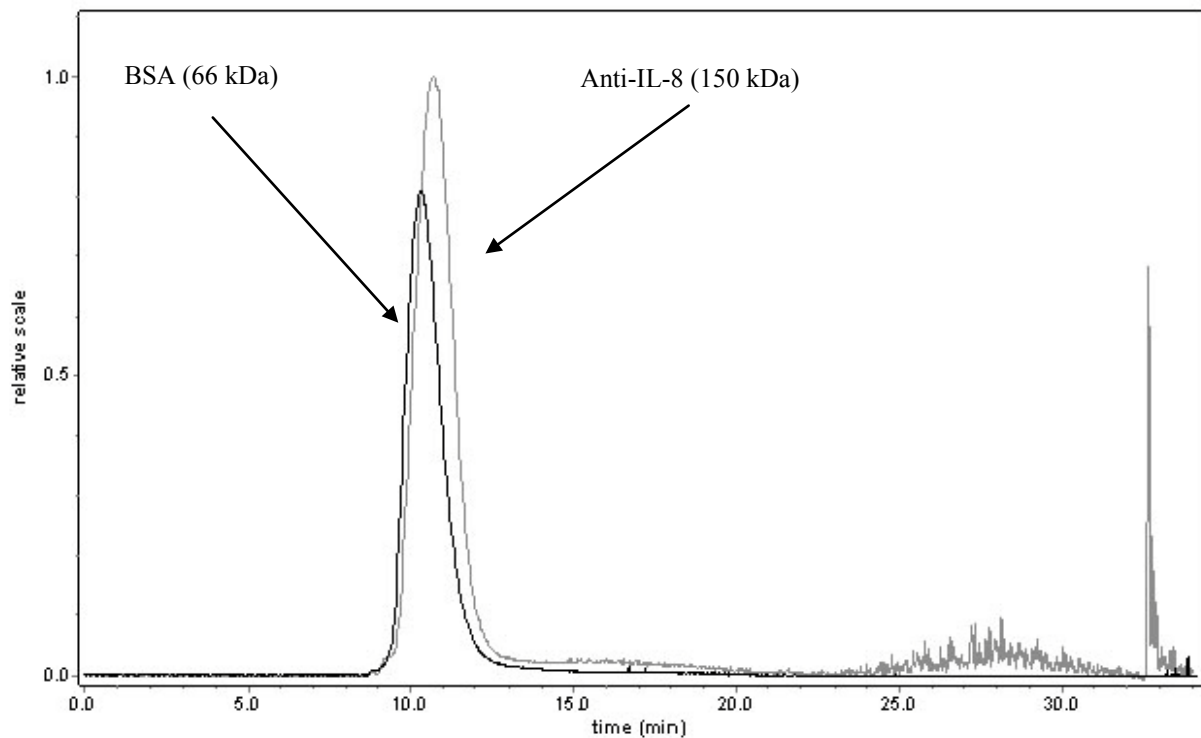


Abbildung 35: Vergleich der Fraktogramme des Anti-Interleukin-8-Antikörpers und von BSA, gezeigt ist jeweils die Partikelgröße.

Auch mittels der Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF) und der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) wurde der Anti-Interleukin-8-Antikörper hinsichtlich der Oligomerbildung analysiert. In der FFF-Messung wurde nur eine einzelne Verteilung gefunden, die dem Antikörper entspricht (Abbildung 34). Weitere Signale, die Oligomeren entsprechen würden, wurden nicht detektiert, das Dimer beispielsweise würde ein Signal bei etwa 20 Minuten ergeben. Ein Vergleich mit der FFF-Messung von BSA, wie sie in Abbildung 35 gezeigt ist, ergibt etwas größere Partikel für den Antikörper, was bei einem gut doppelt so schweren Molekül auch zu erwarten ist. Da in diesem Massenbereich die Trennung mittels FFF schwierig ist, lässt sich der relativ kleine Unterschied erklären. Die DLS des Antikörpers ergibt wie im Falle der FFF nur eine einzelne Verteilung, dadurch kann davon ausgegangen werden, dass der Antikörper rein ist und es in der Lösung keine Oligomere gibt (Abbildung 36), die Partikelgröße liegt bei 10 nm.

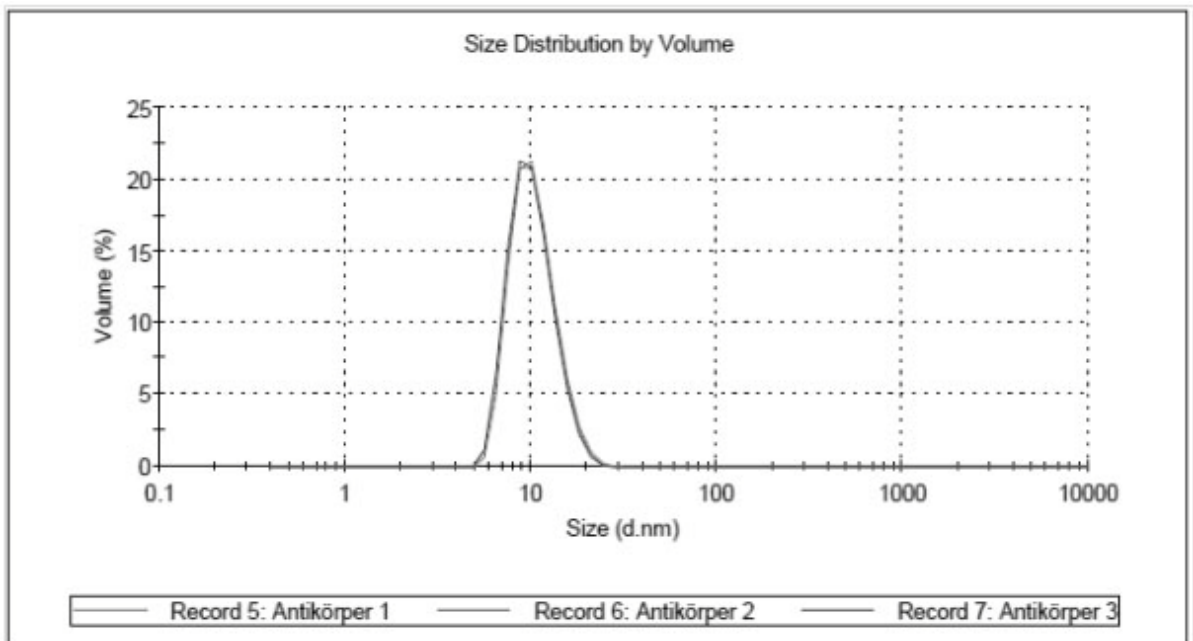


Abbildung 36: DLS-Messung des Anti-IL-8-Antikörpers, volumengewichtet.

Ein bekannter Prozess zur Bildung von Antikörperoligomeren sind pH-Wertänderungen.^[182] Zur Untersuchung dieses Effektes beim Anti-IL-8-Antikörper wurde der pH-Wert schrittweise durch die Zugabe 1 molarer Salzsäure von pH 7 auf pH 1 gebracht, dann durch 1 molare Natriumhydroxidlösung auf pH 10, durch Salzsäure auf pH 6 und schlussendlich mit der Natriumhydroxidlösung auf pH 7. Im Vergleich zur ESI-MS-Messung des Antikörpers, der konstant in einem Puffer bei pH 7 war, kommt es beim Antikörper mit pH-Wertänderung zu keiner Veränderung des Verhältnisses von Monomer zu Dimer. Die Oligomerbildung muss dementsprechend in einem anderen Prozess entstehen. Es stehen dafür zwei mögliche Erklärungen zur Diskussion: Zum einen könnten sich die Oligomere während der Umpufferung mit den Zentrifugenfiltern bilden und zum anderen könnten sie während des Ionisierungsprozesses entstehen. Während des Einsatzes von Cut-off Filtern kommt es zu einer starken Einengung des Flüssigkeitsvolumens und somit zu einer starken Aufkonzentrierung. Da die Untersuchung des Ionisierungsprozesses äußerst schwierig wäre, wurde die Frage der Umpufferung betrachtet. Für dieses Experiment wurden die Arten der Umpufferung variiert. Zum einen wurde die übliche Methode der Cut-off Zentrifugenfilter verwendet und zum anderen wurden Dialyseeinheiten eingesetzt. Die Dialyseeinheiten tauschen den Puffer im Gegensatz zu den Cut-off Zentrifugenfilter ohne signifikante Änderung des Volumens aus. Ein Vergleich mittels ESI-MS-Messungen der verschiedenen Methoden ist in Abbildung 76 (Anhang) zu sehen, wobei beide Messungen bei einer Kollisionsenergie von 10 eV durchgeführt wurden. Es zeigen sich geringe Unterschiede

zwischen den Umpufferungsmethoden: Die Intensität des Dimers beträgt bei den Zentrifugenfiltern 6 % des Monomersignals und bei den Dialyseeinheiten 2 %. Die Erhöhung der Kollisionsenergie auf 50 eV führt zu einem Dimeranteil von 3 % bei den Zentrifugenfiltern und 1 % bei den Dialyseeinheiten. Durch eine Absenkung der Kollisionsenergie auf 1 eV (Abbildung 37) werden die bisher geringen Unterschiede allerdings sehr deutlich. Der Anteil an Dimeren steigt bei den mit Zentrifugenfiltern umgepufferten Anti-IL-8-Antikörpern auf 29 %, während bei den Dialyseeinheiten der Anteil bei 2 % bleibt.

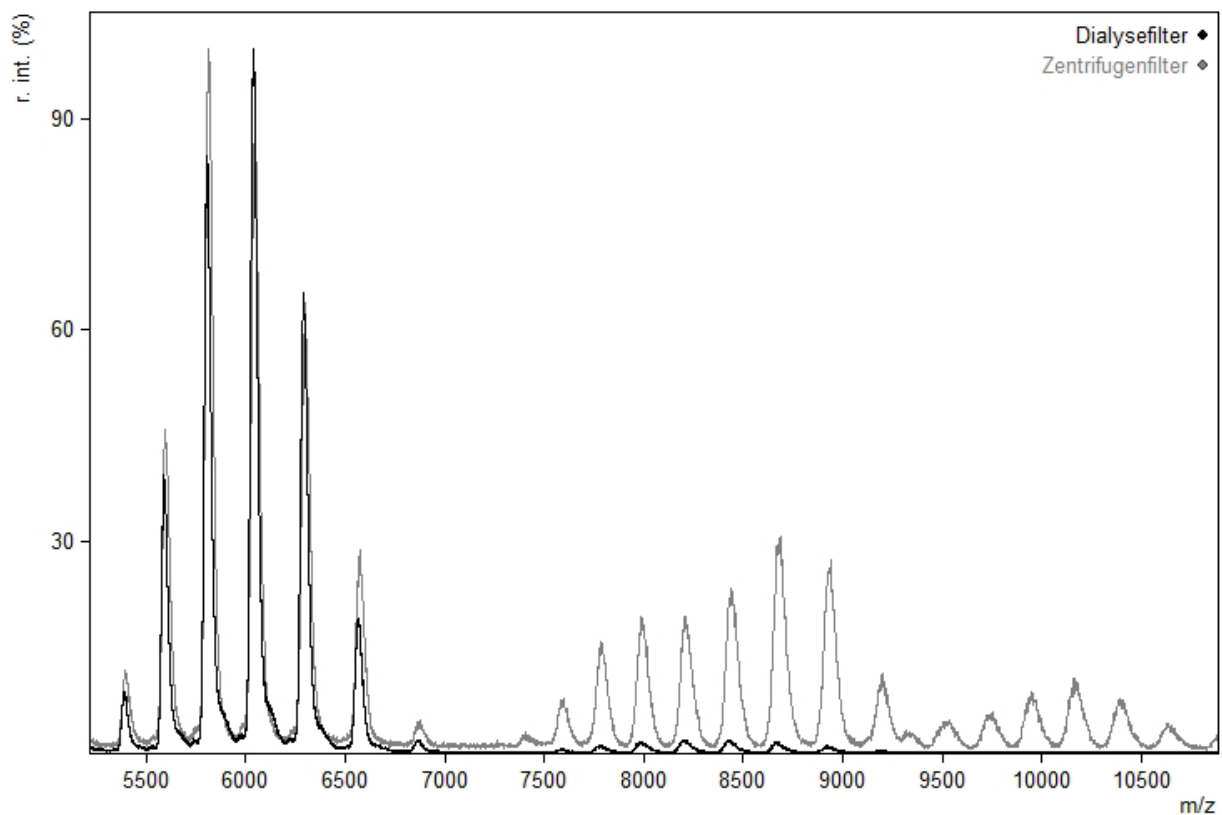


Abbildung 37: Vergleich der ESI-MS Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers, Umpufferung mittels Zentrifugenfilters (grau) und Dialyse (schwarz), 1 eV Kollisionsenergie in 200 mM Ammoniumacetat.

Durch diese Versuche zeigt sich, dass die gefundenen Oligomere primär auf Konzentrationseffekte zurückzuführen sind und weniger auf Prozesse während der Ionisierung. Wie weiterhin gezeigt werden konnte, hat die Kollisionsenergie einen sehr starken Einfluss auf die Stabilität der Oligomere. Des Weiteren ist es für die Bildung und Detektierung nicht kovalenter Komplexe vorteilhaft, möglichst wenige Ladungen auf das Antikörpermolekül zu übertragen. Diese Erkenntnisse können für später folgende Untersuchungen von weiteren nicht kovalenten Anti-IL-8-Protein Komplexen genutzt werden.

Antikörperfragmente nach Reduktion

Die Reduktion von Antikörpern führt zu sehr spezifischen Fragmenten, wie sie in Abbildung 7 aufgeführt sind. Diese, bedingt durch die besondere Struktur eines Antikörpers, führt zur Abspaltung einzelner Ketten, bzw. zur Spaltung der Disulfidbrücken des Antikörpers in der Hinge-Region. Im Folgenden wurde die Reduktion mittels Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin-Hydrochlorid (TCEP) am Beispiel des Anti-IL-8-Antikörpers untersucht. Dazu wurden die Reduktionen bei 37 °C und bei 50 °C verglichen. Die Reduktion bei 37 °C orientiert sich an Bedingungen, wie sie für chemische Modifikationen verwendet werden und möglichst nativ sind, damit der Antikörper noch aktiv ist.^[68] 50 °C ist eine in der Proteinanalytik gängige Reaktionstemperatur.^[73] Im Verlauf späterer Analysen fanden beide Temperaturen Verwendung, weshalb ein Vergleich der Reduktionsmuster sinnvoll ist. Die Reduktionen wurden jeweils mittels 50 mM TCEP für 30 Minuten durchgeführt. In Abbildung 38 ist das ESI-MS-Spektrum nach der Reduktion bei 50 °C zu sehen. Es sind unterschiedliche Signalserien im Spektrum zu erkennen. Diese Serien entsprechen der leichten Kette (F), dem halben Antikörper (D) und dem kompletten Antikörper (A). Somit verlief die Reduktion nicht vollständig, da in diesem Fall nur die leichte Kette (F) und die schwere Kette (E) zu sehen sein müssten. Eine Berechnung der Massen ergibt für die leichte Kette 23755 ± 46 Da ($n = 10$), 74589 ± 23 Da ($n = 5$) für den halben Antikörper und 149293 ± 29 Da ($n = 6$) für den kompletten Antikörper. Aus den vorangegangenen Untersuchungen wurde jedoch deutlich, dass die Molekülmasse des kompletten, nicht reduzierten Antikörpers bei einer Kollisionsenergie von 10 eV bei 150504 ± 52 Da ($n = 7$) liegt. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass sich während der Reduktion der Antikörper entfaltet hat und somit weniger nicht kovalent gebundene Lösungsmittelmoleküle im Komplex mit dem Antikörper vorliegen. Eine Erhöhung der Kollisionsenergie führt nicht zu einer signifikanten Veränderung im Verhältnis der Signalintensitäten der unterschiedlichen Signalserien zueinander. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es kein Dimer des halben Antikörpers ist, da dieses sich bei erhöhter Kollisionsenergie spalten würde. Das ESI-MS-Spektrum nach der Reduktion bei 37 °C ist mit dem bei 50 °C im Prinzip deckungsgleich und es konnten keine Unterschiede gefunden werden.

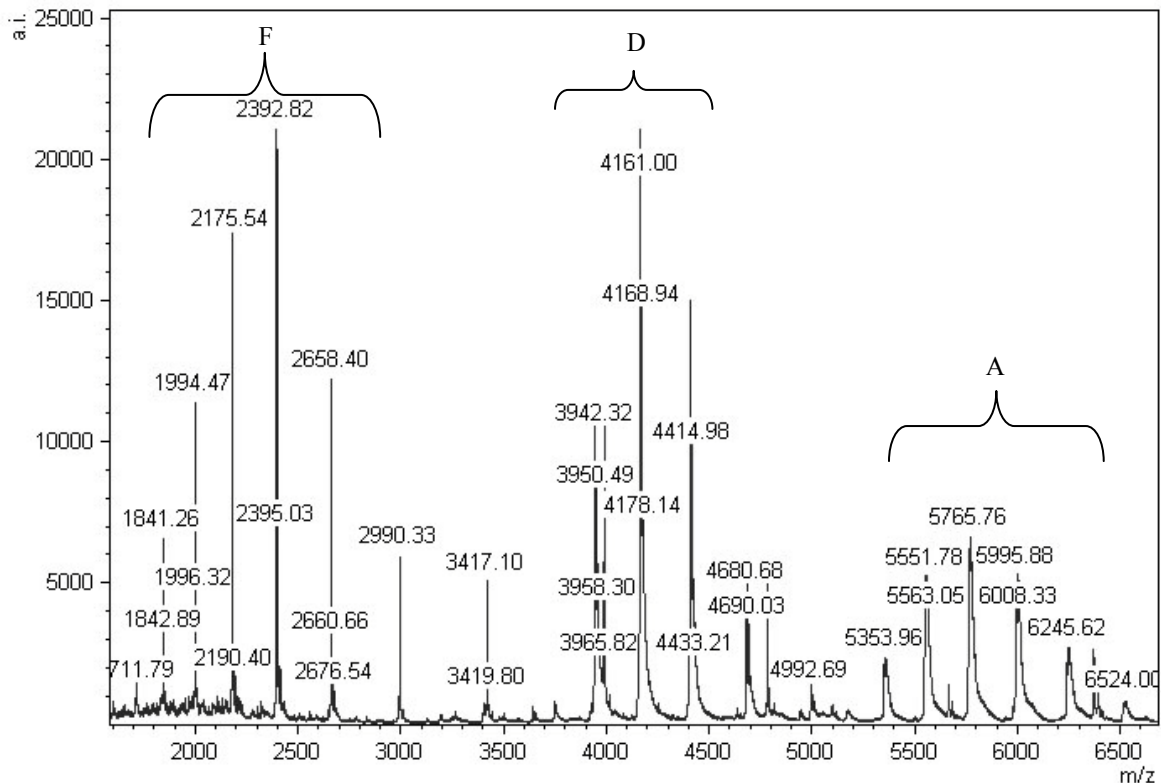


Abbildung 38: ESI-MS-Spektrum des mittels TCEP bei 50 °C reduzierten Anti-IL-8-Antikörpers. Den Signalen sind die Reduktionsprodukte entsprechend Abbildung 7 zugeordnet.

Proteolyse des Anti-IL-8-Antikörpers

Es gibt Proteasen, die sehr spezifische Fragmente von Antikörpern erzeugen, diese unterscheiden sich deutlich von den Fragmenten, die bei einer Reduktion der Disulfidbrücken entstehen. Eine dieser Proteasen ist Pepsin, diese proteolysiert das F_c -Fragment, sodass nur das $F_{(ab)2}$ -Fragment erhalten bleibt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Proteolyse unterhalb der Hinge-Region im F_c -Fragment beginnt.^[240] Für die Untersuchung der Proteolysereaktion wurde der Anti-IL-8-Antikörper mit Pepsin proteolysiert und der zeitliche Verlauf analysiert. Dazu wurden nach einer, zwei, vier und 24 Stunden ESI-MS-Messungen durchgeführt. In Abbildung 39 sind die ESI-MS-Spektren der Messungen nach einer und nach vier Stunden gezeigt. Nach einer Stunde ist die Proteolyse des Antikörpers fast vollständig. Das $F_{(ab)2}$ und das F_c -Fragment können detektiert werden, die Intensität der Signale des $F_{(ab)2}$ -Fragment ist dabei deutlich höher. Nach weiteren drei Stunden können keine Signale des intakten Antikörpers mehr detektiert werden, dies weist auf eine vollständige Proteolyse hin. Auch die Signale des F_c -Fragments werden nach vier Stunden fast kaum noch und nach insgesamt 24 Stunden überhaupt nicht mehr detektiert. Durch das Erscheinen der Signalserie des F_c -Fragments lassen sich Rückschlüsse über den Ablauf der Proteolyse treffen. Wie aus der Literatur bekannt ist, kommt es zuerst zur Abspaltung des F_c -Fragments vom $F_{(ab)2}$ -

Fragment.^[240] Der zweite Schritt besteht in der vollständigen Proteolyse des F_c-Fragments in kleine Peptide, gleichzeitig werden noch Reste des F_c-Fragmentes, die noch am F_{(ab)2}-Fragment verblieben sind, proteolysiert. Diese Proteolyse zeigt sich in der Verschiebung der Signalserien in Abbildung 39 hin zu kleineren *m/z*-Werten, wobei ein Unterschied von 1464 Da festgestellt wurde. Somit konnte erstmals mittels ESI-MS die Proteolyse auf Proteinebene verfolgt werden.

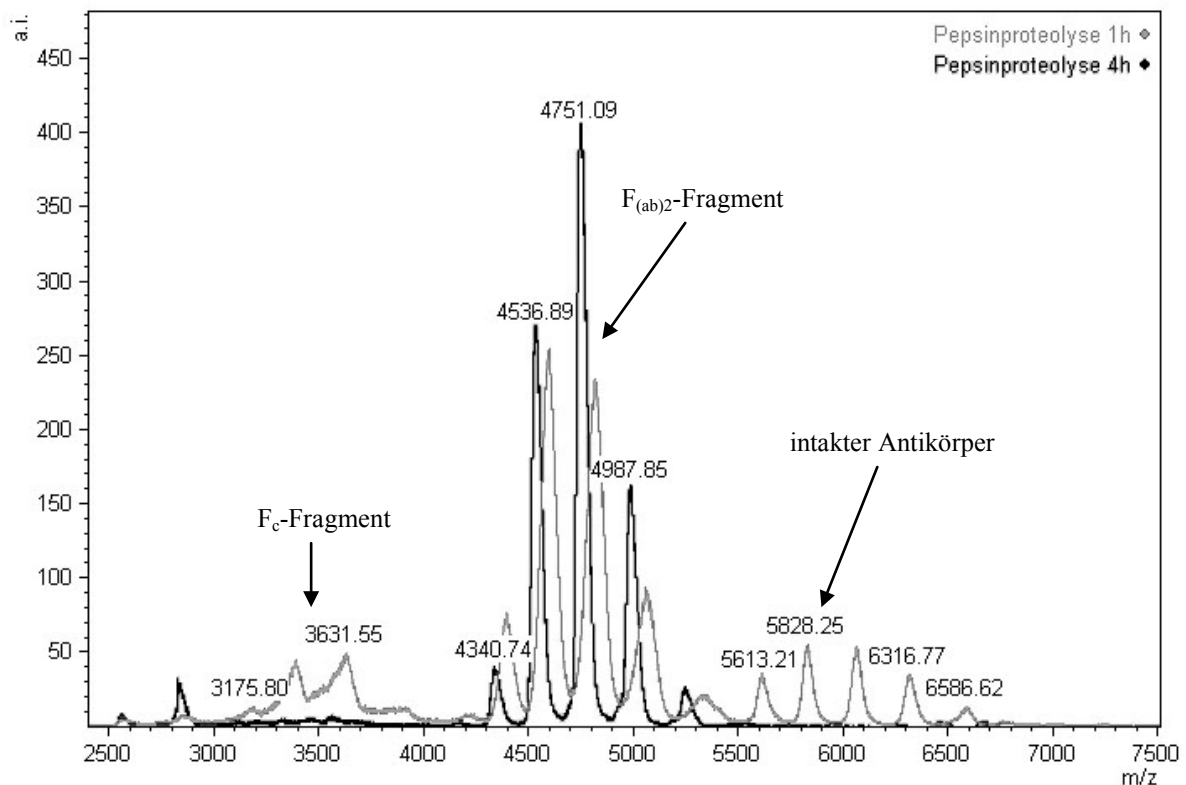


Abbildung 39: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers nach der Proteolyse mit Pepsin nach einer (grau) und vier (schwarz) Stunden. Nach vier Stunden ist der vollständige Antikörper in einzelne Fragmente gespalten worden. Mit längerer Inkubationszeit wird auch das F_c-Fragment proteolysiert.

Eine weitere Protease, die spezifische Antikörperfragmente erzeugt, ist Papain. Je nach Reaktionsführung werden dabei entweder das F_c-Fragment und das F_{(ab)2}-Fragment gebildet oder es entstehen das F_c-Fragment und zwei F_{ab}-Fragmente. In dieser Arbeit wurde die Reaktionsführung so gewählt, dass das F_c-Fragment und die zwei F_{ab}-Fragmente gebildet wurden. Durch die Nutzung von Pepsin ist das F_{(ab)2}-Fragment zugänglich, sodass für die zweite Reaktionsroute keine Notwendigkeit bestand. Die gebildeten Fragmente weisen alle eine Molekülmasse von etwa 50 kDa auf. Aus diesem Grunde wurden neben den einfachen Messungen der Proteolyseprodukte auch deren Reinigungen mit Protein A durchgeführt. Das Protein A war dazu auf Magnetic Beads immobilisiert. Zur Trennung wurde ausgenutzt, dass

das F_c-Fragment an das Protein A bindet, während dies die F_{ab}-Fragmente nicht tun und somit abgetrennt werden können. Beide Proben wurden getrennt voneinander mittels MALDI-MS gemessen. Die Spektren beider Messungen sind in Abbildung 40 dargestellt, wie in dieser zu sehen ist, kann bei der nicht mit Protein A aufgereinigten Probe (grau) das Papain mit einer Masse von 23 kDa detektiert werden, auch das F_{ab}-Fragment mit einer Masse von 50 kDa ist deutlich zu erkennen. Jedoch gibt es nicht wie erwartet ein zweites Signal bei etwa 50 kDa, dafür aber eins bei ungefähr 25 kDa. Nach der Aufreinigung mit Protein A ist nur ein Signal und ebenfalls nur bei etwa 25 kDa zu sehen. Da durch die Reinigung mit Protein A sowohl das nicht bindende Papain als auch das F_(ab)-Fragment abgetrennt wurden, kann es sich dabei nur um das F_c-Fragment handeln. Daraus kann geschlossen werden, dass das F_c-Fragment in die beiden Kettenteile zerfallen ist. Dies ist dadurch erklärbar, dass bei der Probenvorbereitung für Kristallisation der Analytmoleküle mit der Matrix organische Säuren und organische Lösungsmittel eingesetzt werden, die zu einer Denaturierung und somit zur Spaltung nicht kovalenter Komplexe führen,^[241] da im F_c-Fragment, im Gegensatz zum F_{ab}-Fragment, keine Disulfidbrücken mehr existieren. Die bei den ESI-MS-Messungen vorteilhaften Ammoniumpuffer konnten für die MALDI-MS-Analysen nicht genutzt werden, da die Salze hier den Ionisierungsprozess stören.^[241] Die gleichen Proben wurden auch mit dem High-Mass-Q-ToF (MS Vision, Almere, Niederlande) gemessen. Nach der Aufreinigung mittels Magnetic Beads ist nur eine Signalserie zu erkennen, dabei handelt es sich um das F_c-Fragment. Bei der nicht aufgereinigten Probe sind mehrere Peakserien zu sehen (Abbildung 41). Dabei handelt es sich um das F_{ab}-Fragment und das F_c-Fragment. Beide Signalserien überlappen und erschweren somit die klare Massenbestimmung. Das F_c-Fragment liegt bei diesen ESI-MS-Messungen im Massenbereich von 50 kDa und somit als intakter, nicht kovalenter Komplex vor.

Die Analyse der unterschiedlichen Antikörperfragmente ist mittels ESI-MS möglich und bietet somit Ansätze, um eventuell schwer zu analysierende Proteinkomplexe zu untersuchen. Darüber hinaus können damit auch Modifikationen genauer untersucht und lokalisiert werden. Durch die Reduzierung der Molekülmasse werden die Halbwertsbreiten der Signale schmaler, sodass Basislinientrennungen einfacher werden und sich allgemein die Komplexität der Spektren reduziert.

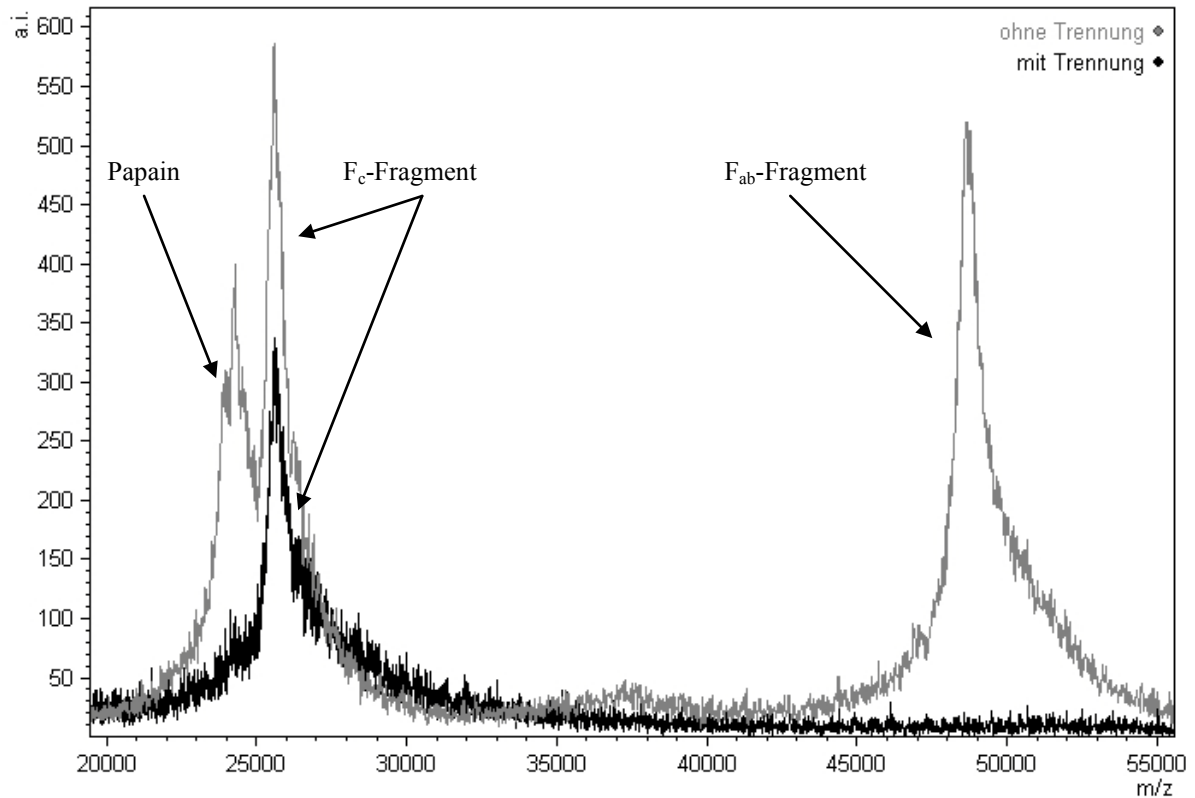


Abbildung 40: MALDI-MS-Spektren der ungereinigten Papainproteolyse des Anti-IL-8-Antikörpers (grau) und nach (schwarz) der Aufreinigung mittels Protein A. Während in der ungereinigten Papainproteolyse Papain und das F_c - und das F_{ab} -Fragment vorhanden sind, ist es in der gereinigten nur das F_c -Fragment.

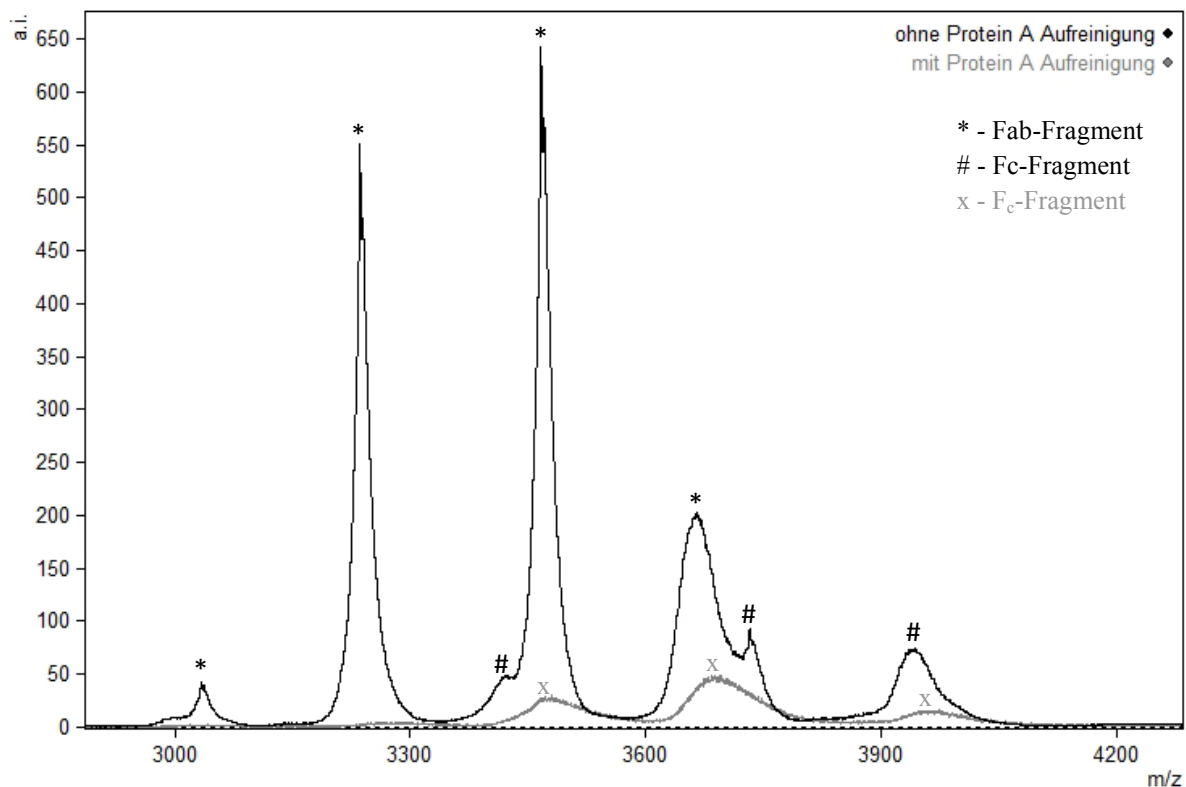


Abbildung 41: ESI-MS-Spektren der ungereinigten Papainproteolyse des Anti-IL-8-Antikörpers (schwarz) und nach (grau) der Aufreinigung mittels Protein A bei 10 eV Kollisionsenergie. In der nicht aufgereinigten Lösung ist das F_{ab} - und das F_c -Fragment vorhanden, in der gereinigten nur das F_c -Fragment.

Antikörpermodifikationen

Die posttranslationalen Modifikationen von Antikörpern sind entscheidend für viele ihrer Funktionen, da sie für zahlreiche ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften verantwortlich sind.^[242] Auch in den ESI-MS Messungen des Anti-IL-8-Antikörpers sind diese zu finden. Wie bereits in einigen ESI-MS Spektren gezeigt (Abbildung 23 und Abbildung 24), kommt es bei der Erhöhung der Kollisionsenergie zur Aufspaltung der einzelnen Signale. Es lassen sich sehr klar vier Signale erkennen, diese sind aus dem einzelnen Signal bei geringer Kollisionsenergie (10 eV) hervorgegangen. Die gleichzeitige Verschiebung zu geringeren m/z -Werten kommt durch den Verlust an Lösungsmittelmolekülen, bedingt durch die erhöhte Kollisionsenergie, zustande. Diese Vielzahl an nicht kovalent gebundenen Lösungsmittelmolekülen erhöht die detektierte Masse des Antikörpers. Da die Anzahl der Lösungsmittelmoleküle zwischen den einzelnen Antikörpermolekülen variieren kann, führt dies zu einer starken Signalverbreiterung. Somit werden die Signale der Modifikationen überdeckt und lassen sich erst nach Entfernung der Solventmoleküle wieder beobachten. In Abbildung 42 sind die Abstände zwischen den unterschiedlichen Peaks dargestellt. Diese Abstände bewegen sich zwischen 149 und 162 Da, wobei die Genauigkeit der ersten beiden Werte deutlich besser ist, da die Halbwertsbreiten dieser Signale kleiner sind und somit die Bestimmung der Masse genauer ist. Die Signalaufspaltung kann durch posttranslationale Modifikationen erklärt werden, wobei unterschiedliche Glykosylierungen des F_c -Fragmentes am wahrscheinlichsten erscheinen. Dass sich die Glykosylierungen eines Antikörpers voneinander unterscheiden können, ist bekannt, auch dass diese unterschiedlichen Modifikationen nebeneinander vorkommen, ist literaturbekannt.^[243] Die gleichzeitige Messung dieser verschiedenen Modifizierungen ist bisher äußerst selten.^[110]

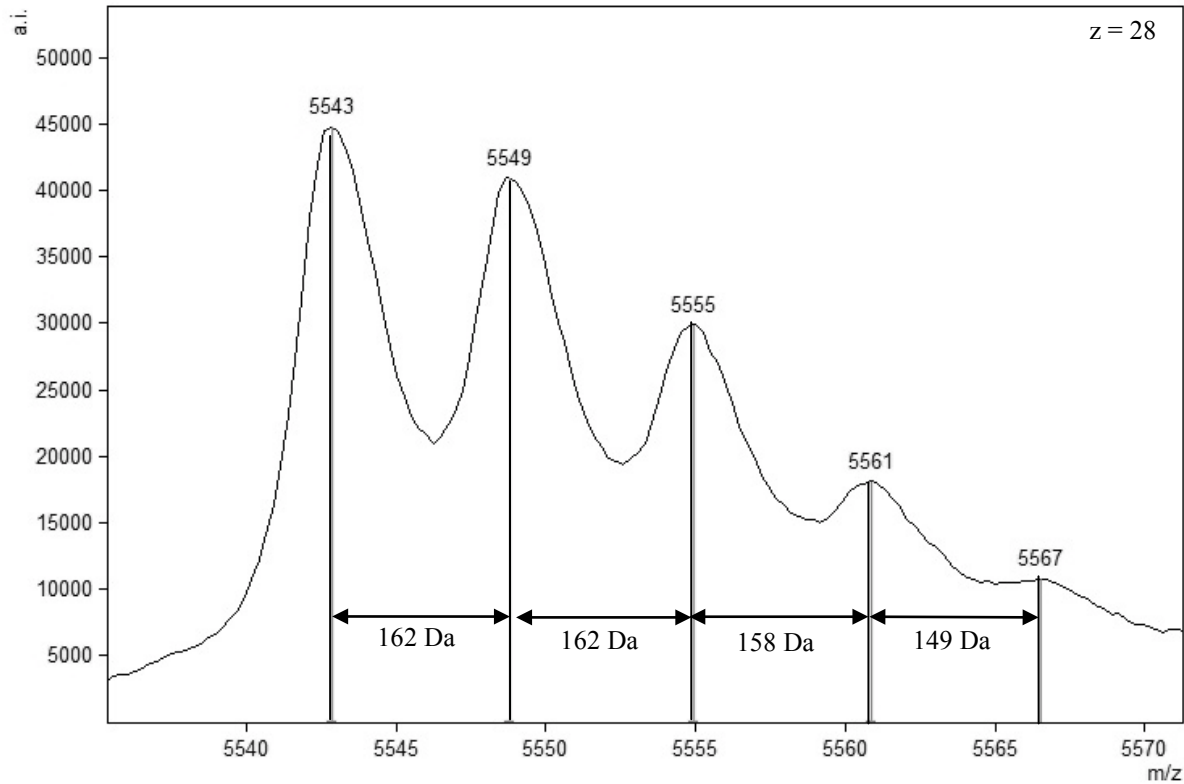


Abbildung 42: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers. Die Unterschiede zwischen den Signalen können durch unterschiedliche Glykosylierungen erklärt werden.

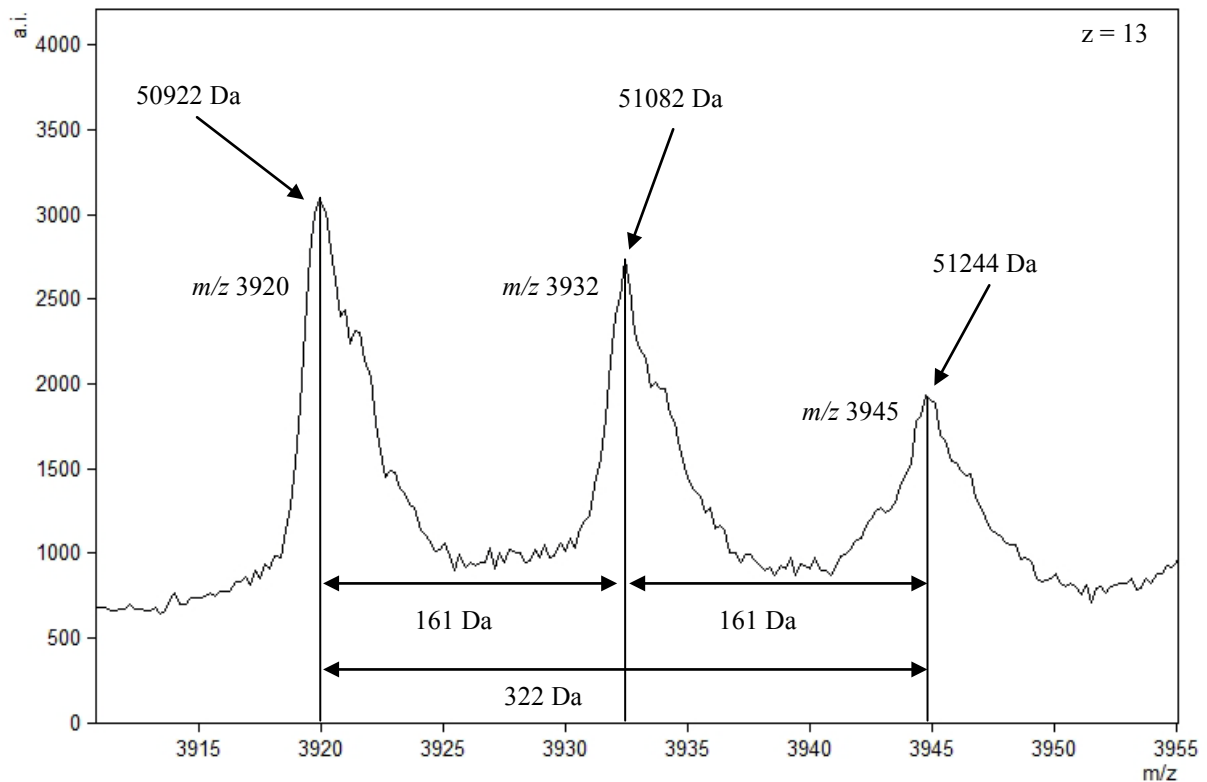


Abbildung 43: ESI-MS-Spektrum des F_c -Fragments des Anti-IL-8-Antikörpers bei einer Kollisionsenergie von 100 eV.

Die gefundenen Signalaufspaltungen des Antikörpers lassen sich auch im F_c -Fragment des Anti-IL-8-Antikörpers (Abbildung 43) nachweisen. Die Unterschiede entsprechen mit 161 Da den Differenzen im vollständigen Antikörper. In der Literatur wurden in ESI-MS-Messungen von Antikörpern Massenunterschiede von 162 Da als Hexosen identifiziert.^[234, 244] Auch im Antikörperdimer konnten Signalaufspaltungen detektiert werden (Abbildung 77, Anhang). Einige der Massenunterschiede passen ebenfalls gut zu Glykosylierungen, allerdings gibt es auch einige Abweichungen, was jedoch auf die schlechte Auflösung der Signale im m/z -Bereich von 7300 bis 8100 zurückzuführen ist. Dass diese Modifikationen auch in den ESI-MS-Messungen des Dimers gefunden werden können, ist, soweit bekannt ist, noch nicht in der Literatur beschrieben worden. Um zu überprüfen, ob es sich bei den verschiedenen Signalen tatsächlich um verschiedene Glykosylierungen des F_c -Fragmentes handelt, wurden die Zucker mit dem Enzym PNGase F entfernt und der deglykosylierte Antikörper anschließend mittels ESI-MS analysiert (Abbildung 44). Eine Deglykosylierung sollte zu einem einzelnen, scharfen Signal im ESI-Spektrum führen, wenn es sich tatsächlich um Glykosylierungen handeln sollte. Durch die Proteolyse mit PNGase F kommt es zu einer deutlichen Verschiebung der Signale hin zu kleineren m/z -Werten und die Massenverringering des Anti-IL-8-Antikörpers von 2844 Da liegt im erwarteten Bereich einer Deglykosylierung (Tabelle 18, Anhang).^[36, 235]

Nach der Deglykosylierung kann auch weiterhin eine Signalaufspaltung detektiert werden. Diese Signalaufspaltung deutet auf weitere Modifikationen hin. Eine bekannte Modifikation sind C-terminale Lysine, welche durch die Proteolyse mittels Carboxypeptidase B abgespaltet werden. Der Vergleich dieser Proteolyse mit dem mittels PNGase F deglykosylierten Anti-IL-8-Antikörper zeigte jedoch keinen Unterschied. Somit können C-terminale Lysine als Modifikation und Ursache der Signalaufspaltung ausgeschlossen werden.

In den ESI-MS-Spektren des reduzierten Antikörpers lassen sich bei den Signalen der schweren Kette Signalaufspaltungen erkennen, die durch die bereits beschriebenen Glykosylierungen erklärt werden können. Jedoch weisen auch die leichten Ketten eine Signalaufspaltung auf, was auf eine Modifizierung dieser Ketten hinweist. Auch im $F_{(ab)2}$ -Fragment (Abbildung 45) kann eine Signalaufspaltung detektiert werden. Da C-terminale Lysine und die bereits untersuchte Glykosylierung sich im F_c -Fragment befinden, müssen weitere Modifikationen die Erklärung liefern.

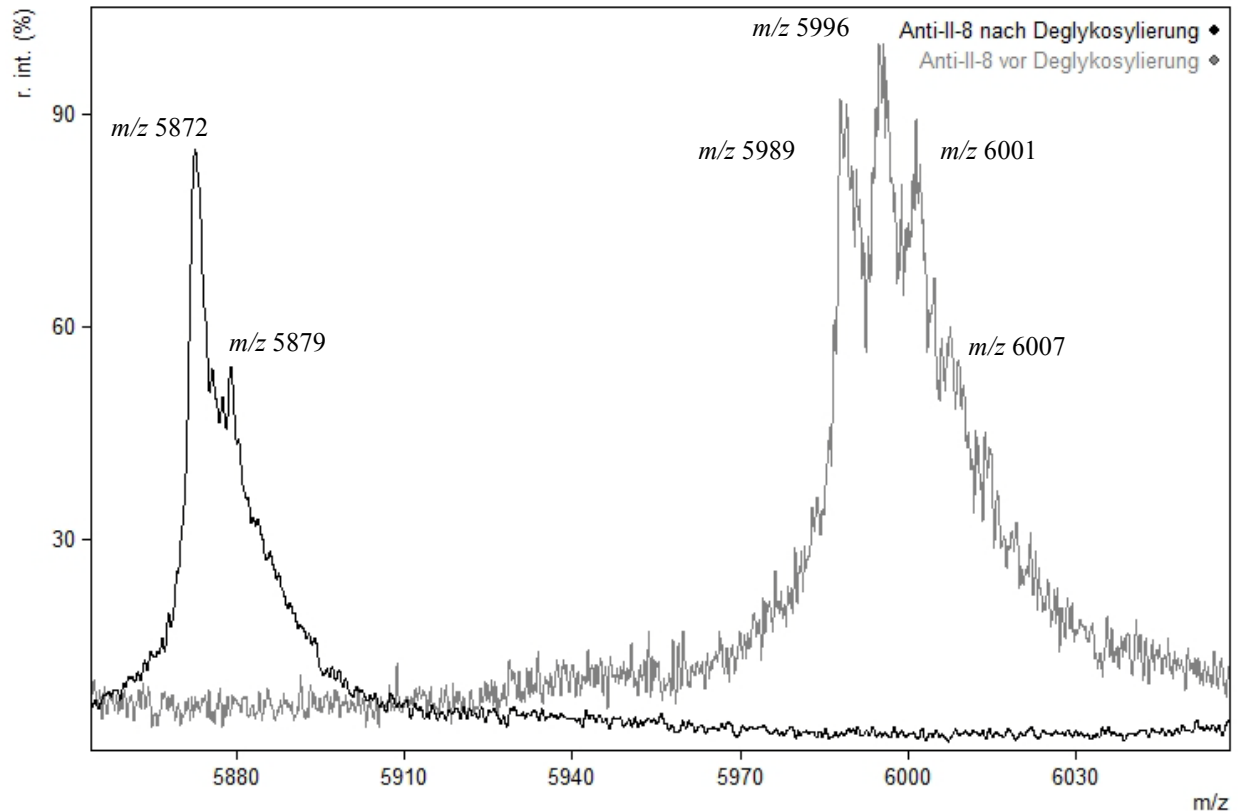


Abbildung 44: Vergleich von ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers vor Form (grau) und nach der Deglykosylierung mittels PNGase F (schwarz) bei einer Kollisionsenergie von jeweils 100 eV, die Ladung der einzelnen Signale beträgt 25. Der Unterschied beträgt 2844 Da, was der Deglykosylierung entspricht. Die verbleibende Signalaufspaltung deutet auf weitere Modifikationen hin.

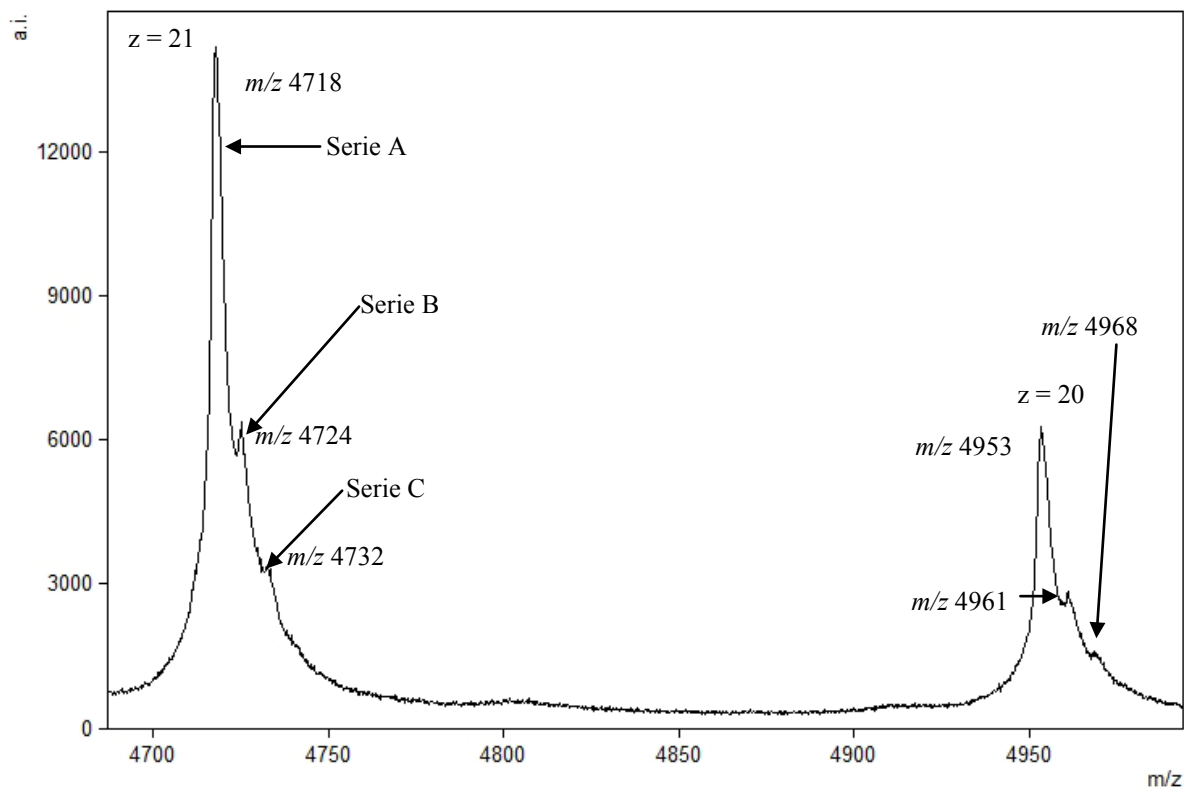


Abbildung 45: ESI-MS-Spektrum des $F_{(ab)2}$ -Fragments des Anti-IL-8-Antikörpers bei einer Kollisionsenergie von 100 eV.

Die einzelnen Peaks des $F_{(ab)2}$ -Fragments spalten sich in drei Serien auf, wobei der Massenunterschied zwischen den Serien A und B bei 130 Da und zwischen B und C 155 Da beträgt. Dies bedeutet, dass ein Teil der Modifizierungen von bisher unbekannten Quellen im $F_{(ab)2}$ -Fragment stammt. Neben den bekannten Glykosylierungen und den C-terminalen Lysinen gibt es noch weitere mögliche Modifizierungen: Desamidierungen, Methioninoxidierungen, Sialyierung und die Umwandlung von Glutamin in Pyro-Glutamin.^[245-247] Alle diese Modifizierungen haben eine geringere Masse als die der gefundenen Abstände von 130 bzw. 155 Da im $F_{(ab)2}$ -Fragment. Eine Kombination mehrerer dieser Modifikationen könnte die Massenunterschiede erklären, allerdings würden die einzelnen Modifikationen selber mit ihren Massenunterschieden ebenfalls erscheinen, sodass eine andere Modifikation die Erklärung sein muss. Neben den Glykosylierungen des F_c -Fragments gibt es Glykosylierungen auch in einigen Fällen in den leichten Ketten.^[248, 249]

Die Deglykosylierung der leichten Ketten kann mit der Protease Endo- β -N-acetylglucosaminidase F2 (Endo-F2) erreicht werden.^[242, 243] Ein Vergleich beider Proteolysen zeigt keine Unterschiede (Abbildung 78, Anhang), sodass es sich bei den Modifizierungen nicht um Glykosylierungen der leichten Ketten handeln kann. Um welche Modifikationen es sich bei diesem Antikörper handelt, konnte somit leider nicht aufgeklärt werden.

Antikörpermodifikationen durch Derivatisierung

Neben den posttranslationalen Modifikationen gibt es auch Modifikationen, die chemisch eingefügt werden können. Zu diesen gehören die Metallmarkierungen, wie MeCAT-Mal oder als Variante davon das *p*-SCN-Bn-DOTA. Die Metallmarkierung ermöglicht eine anschließende Quantifizierung des Antikörpers durch elementspezifische Methoden wie ICP-MS und damit indirekte Quantifizierung des Antigens. Jedes Molekül dieser Markierungsreagenzien enthält jeweils ein Metallion. Die Strategien für die Markierungen von Proteinen und Peptiden sind von verschiedenen Arbeitsgruppen so weit optimiert worden, damit diese quantitativ verlaufen, was beispielsweise für MeCAT mit einer Iodacetamid-funktionalität gezeigt wurde.^[70, 250] Für Antikörper ist jedoch noch nicht geklärt, inwieweit die Markierungsreaktionen quantitativ sind, aus diesem Grund soll dies am Beispiel des Anti-IL-8-Antikörpers mittels ESI-MS am vollständigen Antikörper untersucht werden. Als erstes Beispiel für einen markierten Antikörper wurde das Markierungsreagenz *p*-SCN-Bn-DOTA(Ho) verwendet, welches mit den Aminen der Lysine oder den endständigen freien Aminen reagiert. Aus der Literatur ist bekannt, dass mittels des Markierungsreagenzes *p*-SCN-Bn-DOTA für BSA ein Markierungsgrad von 4,1 bestimmt werden konnte. Jedoch

befinden sich 59 Lysine in einem BSA-Molekül, sodass die Markierung nicht quantitativ verlief.^[71] Die Untersuchungen des Markierungsgrades eines Anti-Lysozym-Antikörpers führen zu Markierungsgraden von 0,3 bei einem Markierungsreagenzüberschuss von 40 zu 1 und zu einem Markierungsgrad von 1,6 bei einem Überschuss von 100 zu 1.^[251] Diese Untersuchungen erfolgten alle durch die Bestimmung des Metallgehaltes mittels ICP-MS und einer Proteinkonzentrationsbestimmung durch Bradford. Es gab dafür keine ESI-MS-Untersuchungen, aus diesem Grund wurde dies für die Anti-IL-8-Antikörper durchgeführt. Für die ESI-MS-Analysen des markierten Anti-IL-8-Antikörpers wurde dieser zuerst unter den Standardbedingungen und anschließend bei erhöhter Kollisionsenergie von 140 eV gemessen. Es kommt wieder zu der bereits bekannten Verschiebung zu kleineren m/z -Werten und zu einer Aufspaltung der Signale in unterschiedliche Signalserien. Neben den bekannten Serien für die unterschiedlichen Glykosylierungen erscheinen beim markierten Antikörper jedoch noch weitere. Diese haben größere Abstände und beinhalten die bisher bekannten Muster. Der direkte Vergleich des markierten mit dem nicht markierten Antikörper zeigt, dass die erste größere Serie (A) des markierten Antikörpers mit dem Signalmuster des nicht markierten Antikörpers übereinstimmt (Abbildung 46). Die weiteren Peakserien (B und C) haben das gleiche Peakmuster, sind allerdings zu höheren m/z -Verhältnissen verschoben. Der Vergleich der Abstände zwischen diesen unterschiedlichen Serien führt zu einer Massendifferenz von 704 bzw. 727 Da. Das Molekulargewicht einer *p*-SCN-Bn-DOTA(Ho)-Markierung beträgt 712 Da und liegt somit im Bereich der gefundenen Massenunterschiede.

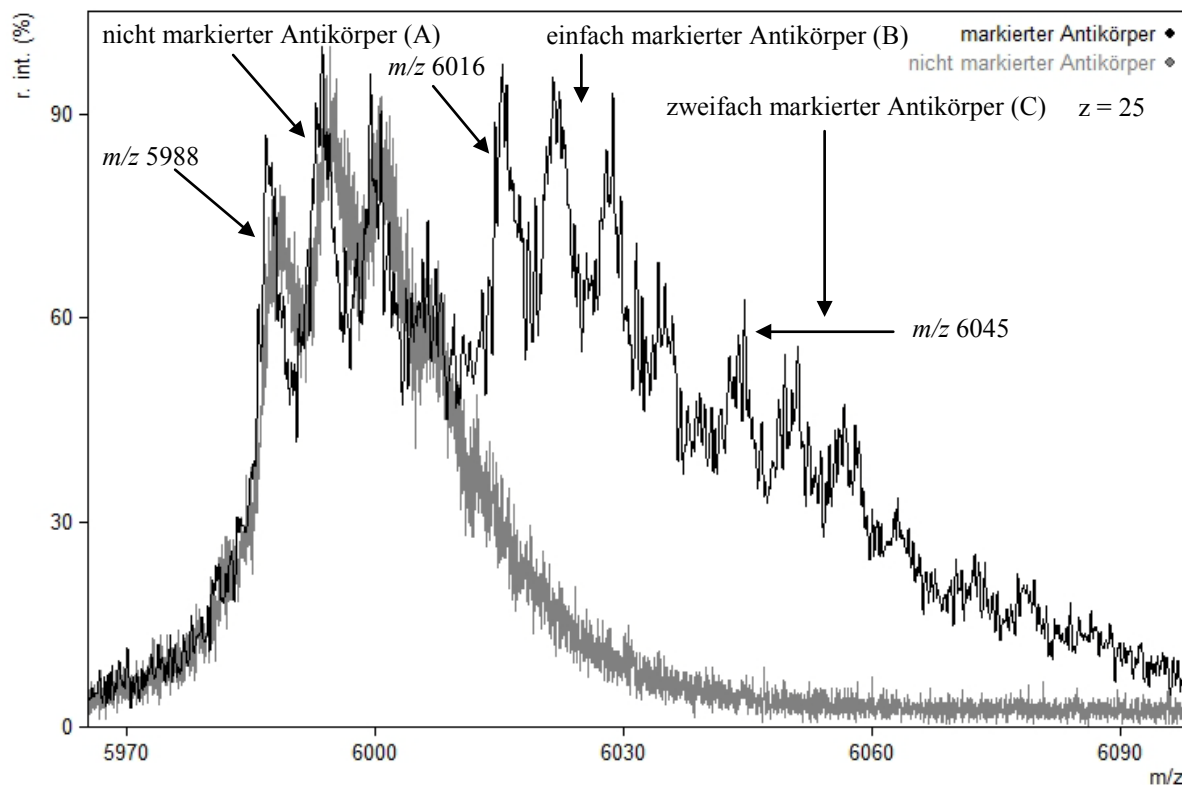


Abbildung 46: Vergleich der ESI-MS-Spektren des nicht markierten (grau) und des *p*-SCN-BN-DOTA(Ho) markierten Anti-IL-8 Antikörpers (schwarz), die Kollisionsenergie betrug 140 eV. Die Markierung wurde mit einem Verhältnis von Markierungsreagenz zu Antikörper von 40 zu 1 durchgeführt. Dieser Überschuss führt zur ein- und zweifach Markierung des Antikörpers, der daneben auch noch unmarkiert vorliegt.

Damit lässt sich schlussfolgern, dass der markierte Antikörper (Abbildung 46) in drei Formen vorliegt: zum einen in der unmarkierten Form (A), in der einfach markierten Form (B) und als drittes in der zweifach markierten Form, wobei die zweifache Markierung eine deutlich geringere Intensität aufweist als die anderen beiden Formen und somit in einer geringeren Konzentration vorliegen dürfte. In einem weiteren Experiment wurde das Verhältnis Reagenz zu Antikörper von 40 zu 1 auf 100 zu 1 erhöht. Das ESI-MS-Spektrum der Messung des so markierten Antikörpers ist in Abbildung 47 zu sehen, auch diesmal wurde die Kollisionsenergie auf 140 eV erhöht. Ähnlich den Ergebnissen beim 40 zu 1 Verhältnis mit drei Signalserien wurden fünf Signalserien in den ESI-MS-Spektren gefunden. Diese Signalserien entsprechen dem Antikörper in seiner unmarkierten bis zur vierfach markierten Form. Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den literaturbekannten Untersuchungen mit BSA.^[71] Bei diesem wurden vier Markierungen gefunden und somit wurden nicht alle vorhandenen Lysine mit *p*-SCN-Bn-DOTA markiert.

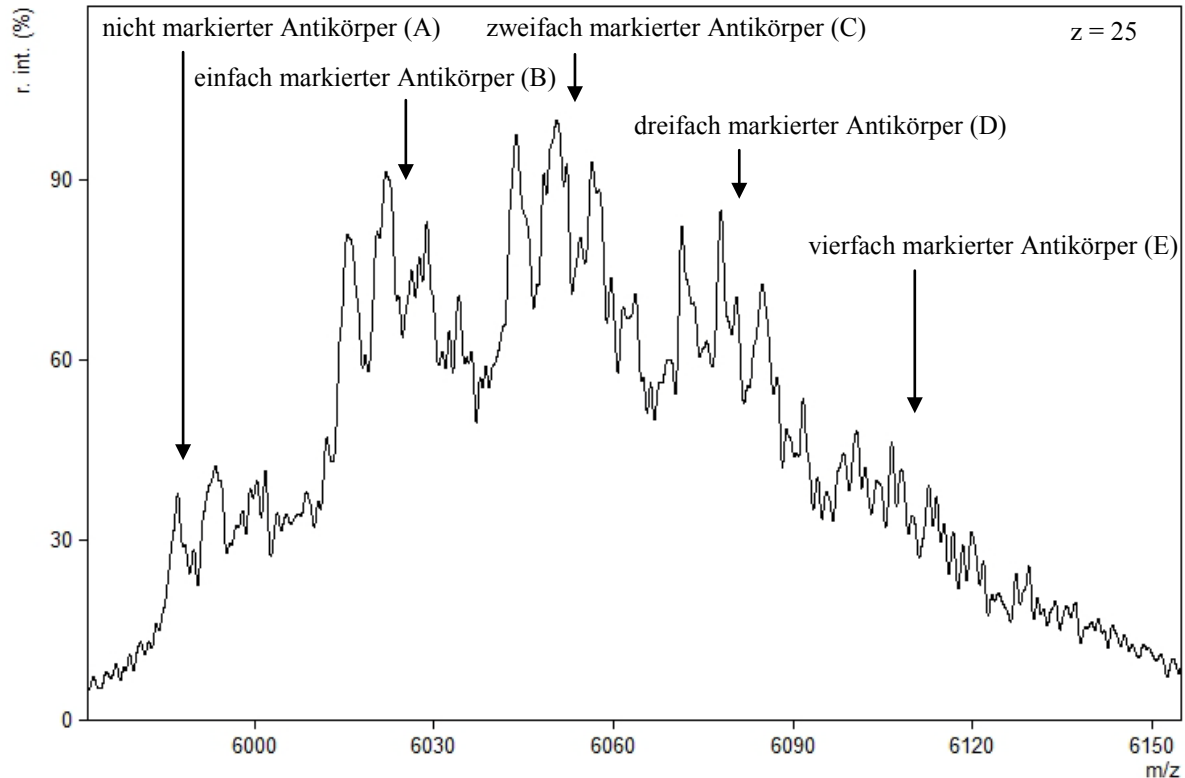


Abbildung 47: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers bei einer Kollisionsenergie von 140 eV. Die Markierung wurde mit einem Verhältnis von Markierungsreagenz zu Antikörper von 100 zu 1 durchgeführt. Überschuss führt zur ein-, zwei-, drei- und vierfachen Markierung des Antikörpers, der daneben auch noch unmarkiert vorliegt.

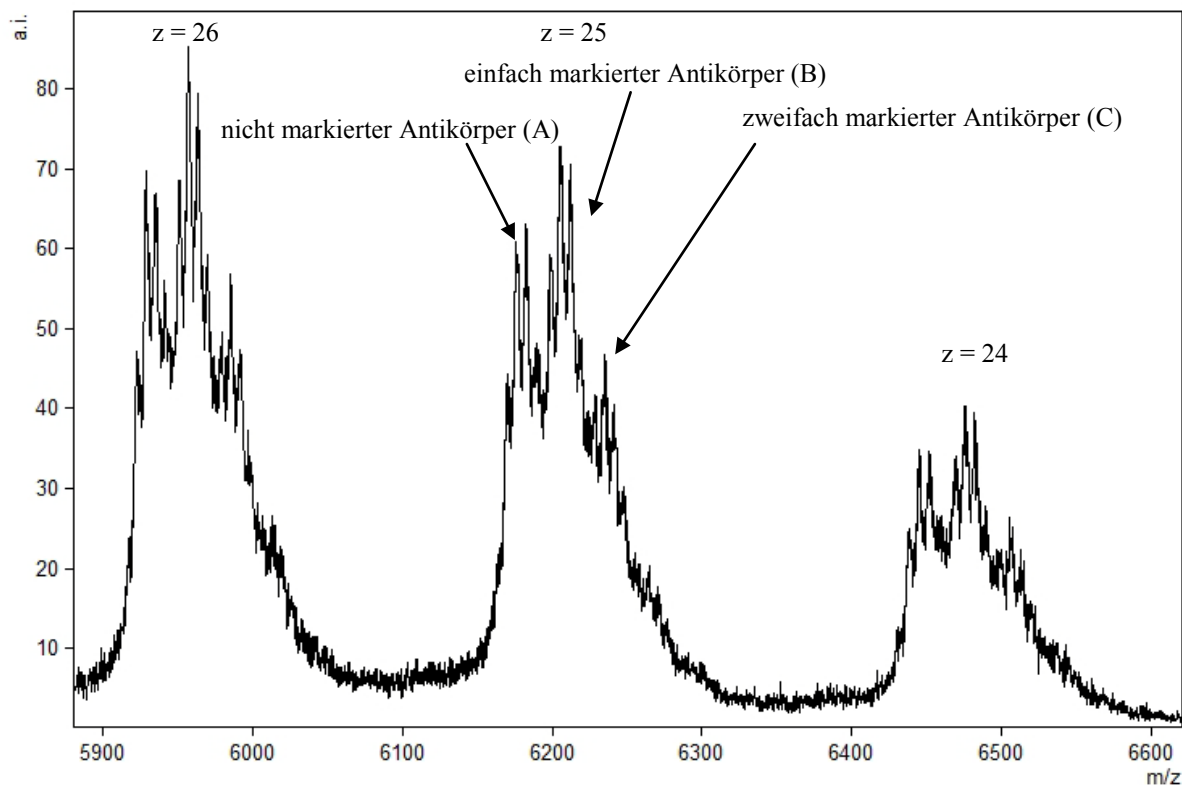


Abbildung 48: ESI-MS-Spektrum des MUC-1-Antikörpers bei einer Kollisionsenergie von 140 eV. Die Markierung wurde mit einem Verhältnis von Markierungsreagenz zu Antikörper von 40 zu 1 durchgeführt. Dieser Überschuss führt zur ein- und zweifachen Markierung des Antikörpers, der daneben auch noch unmarkiert vorliegt.

Um zu überprüfen, ob sich das gefundene Markierungsverhalten auf andere Antikörper übertragen lässt, wurde ein weiterer Antikörper untersucht. Der MUC-1-Antikörper wurde mit einem 40 fachen Überschuss an *p*-SCN-Bn-DOTA(Tb) umgesetzt und mittels ESI-MS analysiert (Abbildung 48). Wie im Falle des Anti-IL-8-Antikörpers lassen sich drei große Signalserien erkennen und diese wiederum entsprechen dem nicht markierten, dem einfach und dem zweifach markierten Antikörper. Eine Übersicht über die verschiedenen Markierungsgrade und die entsprechenden Massen ist in Tabelle 20 (Anhang) aufgeführt. Aus dem Nachweis der Markierung erschließt sich allerdings noch nicht, ob der Antikörper nach der Markierung noch aktiv ist und an das entsprechende Antigen binden kann. Da die Markierung an Aminogruppen bindet, könnten sich die Markierungen auch an den N-terminalen Aminogruppen befinden. Diese bilden jedoch die Antigenbindungsstelle, sodass eine Markierung an dieser Stelle zu einer Inaktivierung des Antikörpers führen würde. Für den MUC-1-Antikörper wurde bereits durch LA-ICP-MS eines entsprechend behandelten Gewebeschnittes gezeigt, dass der Antikörper noch an das Antigen bindet und somit weiter aktiv ist.^[67] Im Falle des Anti-IL-8-Antikörpers wurde die Bindung an das Interleukin-8 mittels eines Dot-Westernblots getestet und durch LA-ICP-MS detektiert.

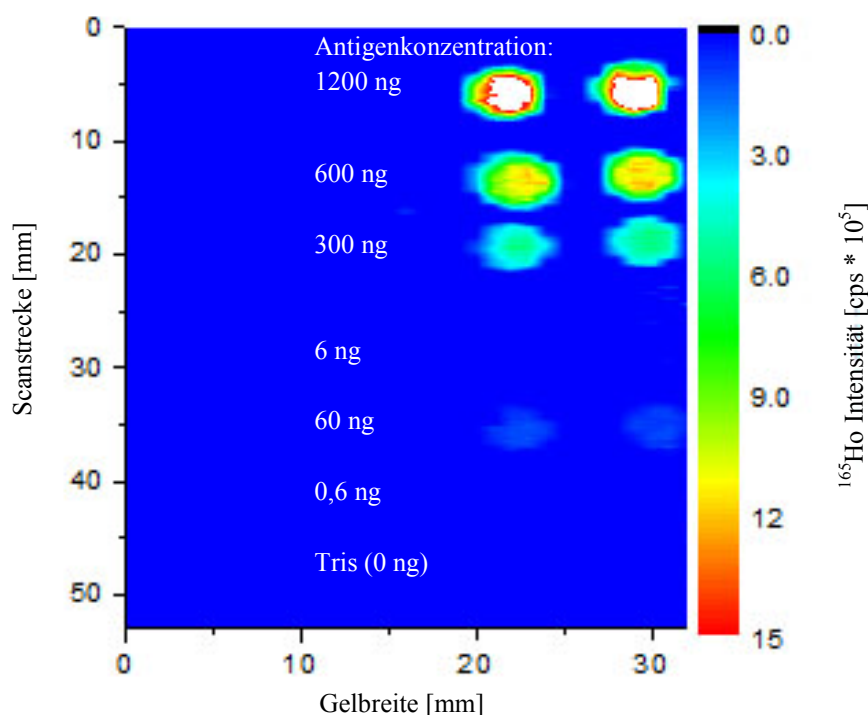


Abbildung 49: LA-ICP-MS-Messung von ^{165}Ho des mit *p*-SCN-Bn-DOTA(Ho) markierten Anti-IL-8-Antikörpers auf einer Dot-Western-Blotoberfläche im Komplex mit dem immobilisierten Antigen in unterschiedlichen Verdünnungen.

In Abbildung 49 ist das Intensitätsprofil des ablatierten Gels gezeigt. Es sind sehr deutlich die verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers zu erkennen, wobei die Intensität des ^{165}Ho

Signals mit steigender Konzentration zunimmt. Die Konzentration des gemessenen Antikörpers in Abhängigkeit der Signalintensität lässt wie erwartet einen linearen Zusammenhang erkennen. Dies belegt, dass der Antikörper auch in höheren Konzentrationen noch an das Antigen bindet (Abbildung 50).

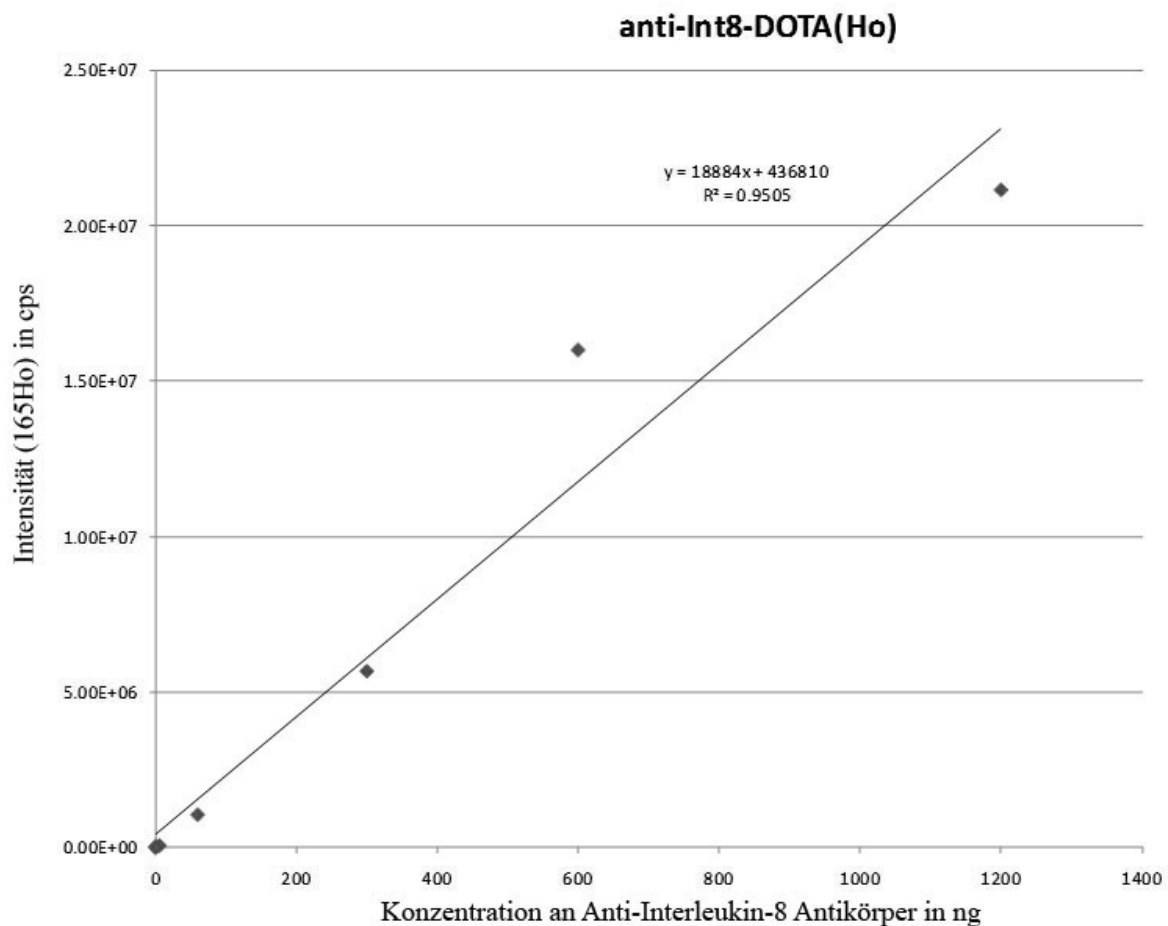


Abbildung 50: Intensität des ^{165}Ho Signals in Abhängigkeit der Konzentration des *p*-SCN-Bn-DOTA(Ho) markierten Anti-IL-8-Antikörpers, gemessen mittels LA-ICP-MS.

Ein Beispiel für ein Intensitätsprofil eines Linienscans bei einer Antikörperverdünnung von 1:1200 ist in Abbildung 51 gezeigt. Die unterschiedlichen Antigenkonzentrationen ergeben entsprechend unterschiedlich intensive ICP-MS Signale. Die Negativkontrolle mit BSA ergab kein Signal in der ICP-MS-Messung von Holmium, was die Selektivität des Antikörpers beweist. Insgesamt lässt sich somit sehr gut nachweisen, dass die Bindung des Antigens an den Antikörper noch möglich und somit der Antikörper noch aktiv ist. Außerdem zeigt es, dass die vorhandenen Markierungen nicht an den N-terminalen Aminosäuren stattgefunden haben.

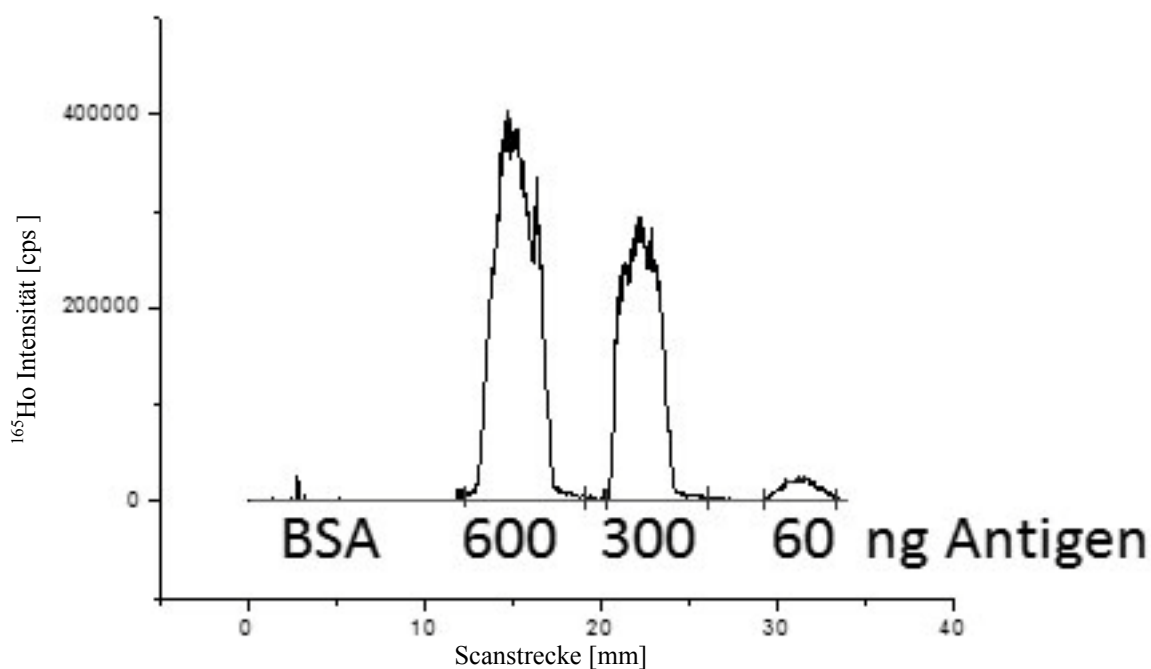


Abbildung 51: Intensitätsprofil eines LA-ICP-MS-Linienscan von *p*-SCN-Bn-DOTA(Ho) markiertem Anti-IL-8-Antikörper, bei einer Verdünnung von 1:2000, auf einer Dot-Westernblotoberfläche mit der Negativkontrolle durch BSA.

Ein weiteres Markierungsreagenz ist MeCAT-Mal, dieses reagiert über eine Maleinimidfunktion mit freien Thiolgruppen. Der Rest des Moleküls besteht ebenso wie das an *p*-SCN-Bn-DOTA aus einem DOTA-Molekül mit einem chelatisierten Metallion. Verwendet wurde ein Reagenz, das mit Praseodym beladen war (Pr-MeCAT-Mal). Da in Proteinen im nativen Zustand die Thiole in Disulfidbrücken gebunden sein können, müssen diese erst durch Reduktion der Disulfidbrücken zugänglich gemacht werden. Unter Berücksichtigung aller Cysteine wäre maximal eine 32-fache Markierung des Anti-IL-8-Antikörpers möglich. Dies würde jedoch sehr harsche Reduktionsbedingungen erfordern und darüber hinaus zu einem kompletten Verlust der nativen Struktur führen. Aus diesem Grund werden schonendere Reduktionsbedingungen verwendet. Die Annahme in der Literatur ist, dass während einer Reduktion zuerst die Disulfidbindungen in der Hinge-Region gebrochen werden und somit der Antikörper noch intakt ist und Antigene binden kann.^[68] Der Grad der Markierung wurde bisher ebenfalls wie bei *p*-SCN-Bn-DOTA mittels einer Messung des Metallgehaltes durch die ICP-MS bestimmt. Um dies zu überprüfen, wurde der Anti-IL-8-Antikörper reduziert und anschließend markiert. Die Messungen erfolgten mit einem ESI-ToF-MS, dem Synapt GS-2 von Waters. Eingesetzt wurde dieses Instrument, da es theoretisch mit diesem Instrument möglich ist, verschiedene Fragmente voneinander zu trennen, was allerdings auf Grund der geringen Intensitäten nicht durchgeführt wurde. In Abbildung 52 ist das ESI-MS-Spektrum der Messung des Antikörpers nach der Markierung mit MeCAT-Mal gezeigt. Es konnten

mehrere Signalserien detektiert werden, die unterschiedlichen Fragmenten des Antikörpers zugeordnet werden konnten, darunter die leichten und schweren Ketten, sowie zwei unterschiedlichen Serien des halben, in der Hinge-Region geteilten Antikörpers. Nicht zu detektieren sind allerdings Signale des kompletten Antikörpers. Im Vergleich mit dem ESI-MS Spektrum des reduzierten Antikörpers (Abbildung 53) ist zu erkennen, dass nach der Reduktion der komplette Antikörper noch teilweise vorhanden ist, auch die zwei Varianten des halbierten Antikörpers sind zu sehen, dafür aber keine Signale der einzelnen leichten und schweren Ketten. Eine Erklärung für den Verlust der leichten Ketten beim reduzierten Antikörper könnte in der Probenvorbereitung zu finden sein, da die dort verwendeten Zentrifugenfilter einen Cut-Off von 50 kDa aufwiesen.

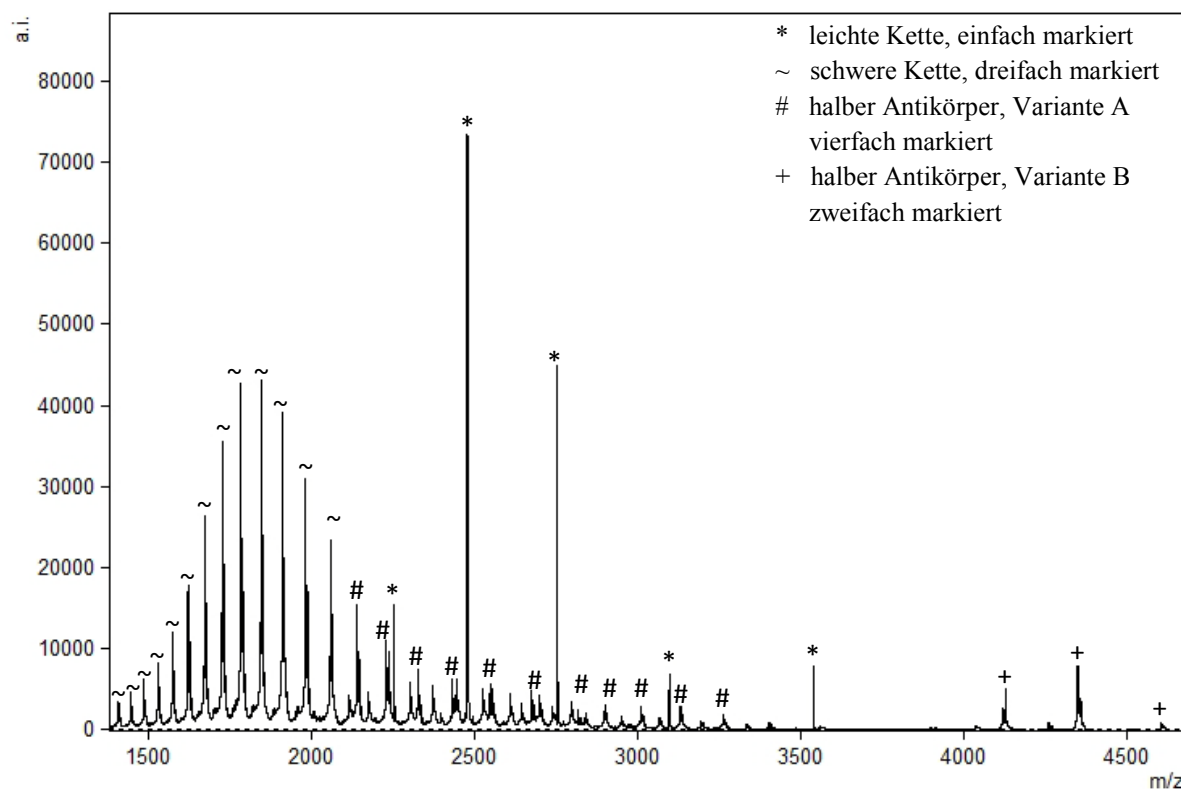


Abbildung 52: ESI-MS-Spektrum des mit Pr-MeCAT-Mal markierten Anti-IL-8-Antikörpers. Die leichte Kette ist einfach und die schwere Kette dreifach markiert. Der halbierte Antikörper liegt in zwei Varianten vor, wobei die Variante A vierfach und die Variante B zweifach markiert ist.

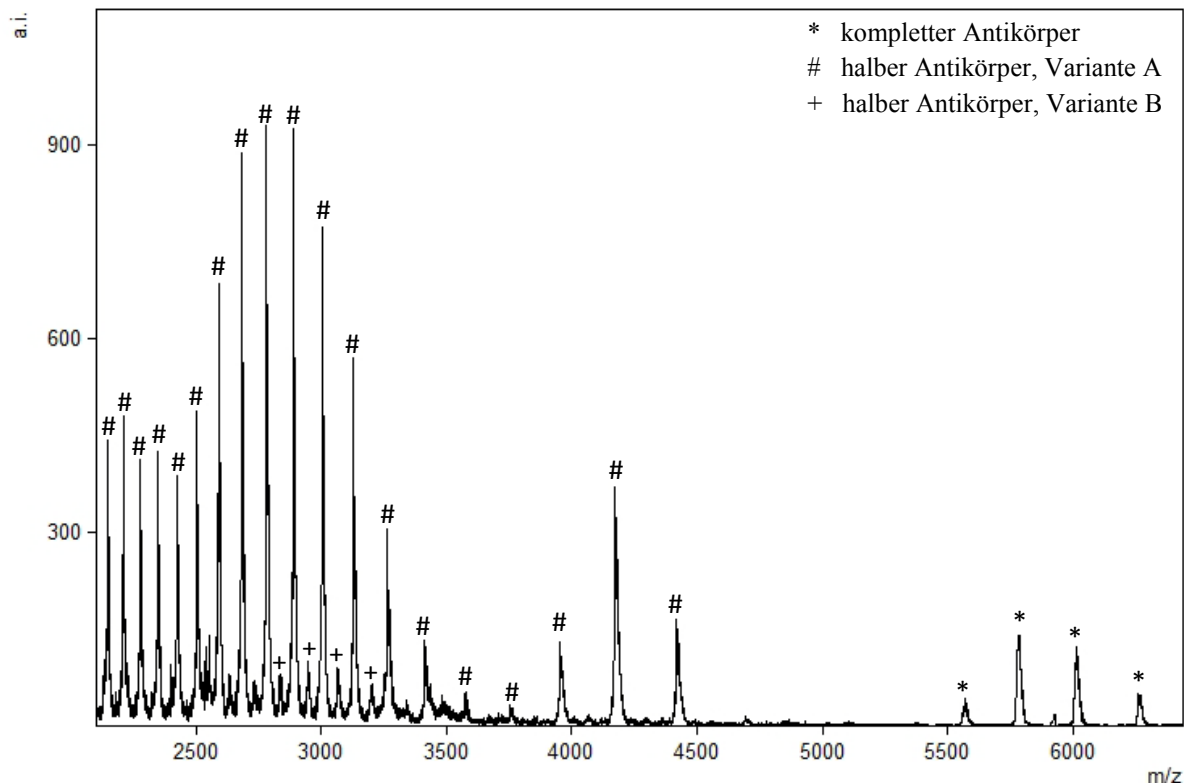


Abbildung 53: ESI-MS-Spektrum des mittels TCEP reduzierten Anti-IL-8-Antikörpers. Zwei Varianten des halbierten Antikörpers können neben dem kompletten Antikörper detektiert werden.

Trotz des Einsatzes der Zentrifugenfilter sind leichte Ketten bei der Messung des markierten Antikörpers zu finden. Eine Übersicht über die verschiedenen Massen ist in Tabelle 9 zu sehen. Als Referenzwert für die leichte Kette des reduzierten Antikörpers wurden Ergebnisse separater Untersuchungen der Reduktion mittels TCEP verwendet. Für die Masse der schweren Kette gab es bislang keine Werte, weshalb hier auch kein Vergleichswert und somit auch kein Markierungsgrad angegeben werden kann. Der halbierte Antikörper liegt in beiden Experimenten in zwei Formen (Varianten A und B) vor. Diese Varianten könnten durch eine Deglykosylierung des Antikörpers begründet werden, da die Molekülmasse dieser Signalserie dem vollständig deglykosylierten Anti-IL-8-Antikörper entspricht (Abbildung 79, Anhang). Der in diesen Pr-MeCAT-Mal Untersuchungen eingesetzte Anti-IL-8-Antikörper entstammte einer anderen Produktionscharge, was eine Erklärung für diesen Befund liefert. Durch den Vergleich der Massen des reduzierten und des markierten Antikörpers kann der Markierungsgrad bestimmt werden, die Massedifferenz für eine Markierung beträgt 768,2 Da. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Markierungsgrade ist in Tabelle 10 gezeigt, darin sind beide Varianten des in der Hinge-Region geteilten Antikörpers aufgeführt. Die Markierungsgrade liegen beim Vergleich der Varianten um vier. Der prinzipiell mögliche Vergleich zwischen verschiedenen Varianten führt zu einem Markierungsgrad von zwei bzw.

sechs und bei der leichten Kette gibt es eine Markierung. Eine vier- oder sechsfache Markierung des halbierten Antikörpers bedeutet eine Markierung an intramolekularen Disulfidbrücken, während eine zweifache für eine Markierung der Hinge-Region spricht. In jedem Fall führt eine Reduktion einer Disulfidbrücke zur Markierung beider freien Schwefel, da keine ungerade Zahl an Markierungen detektiert werden konnte. Ausschließlich die leichte Kette weist eine einzelne Markierung auf, diese jedoch weist auch nur eine intermolekulare Disulfidbrücke auf.

Tabelle 9: Überblick der Molekülmassen der einzelnen reduzierten bzw. Pr-MeCAT-Mal markierten Anti-IL-8-Antikörperfragmente und deren Massenunterschiede.

	Masse des Fragments (red. Anti-IL-8)	Masse des Fragments (markierter Anti-IL-8)	Massenunterschied
halbierter Antikörper	73.644,3 ± 34,6 Da (Variante A)	76.634,0 ± 6,3 Da (Variante A)	2989,7 Da
halbierter Antikörper	75.020,7 ± 12,7 Da (Variante B)	78.223,4 ± 6,9 Da (Variante B)	3202,7 Da
halbierter Antikörper	73.644,3 ± 34,6 Da (Variante A)	78.223,4 ± 6,9 Da (Variante B)	4579,1 Da
halbierter Antikörper	75.020,7 ± 12,7 Da (Variante B)	76.634,0 ± 6,3 Da (Variante A)	1613,3 Da
schwere Kette		53.458,1 ± 1,7 Da	
leichte Kette	23.756,0 Da	24.756,2 ± 0,1 Da	1000,2 Da

Tabelle 10: Überblick der Markierungsgrade der einzelnen Pr-MeCAT-Mal markierten Antikörperfragmente aus den Messungen des reduzierten und des markierten Anti-IL-8-Antikörpers (siehe Tabelle 9).

	Masse des Fragments (markierter Anti-IL-8)	Markierungsgrad
halbierter Antikörper	76.634,0 ± 6,3 Da	3,89
halbierter Antikörper	78.223,4 ± 6,9 Da	4,17
halbierter Antikörper	76.634,0 ± 6,3 Da	2,10
halbierter Antikörper	78.223,4 ± 6,9 Da	5,96
leichte Kette	24.756,2 ± 0,1 Da	1,30

Weder der Antikörper noch dessen Fragmente wurden komplett markiert, aus diesem Grund wurde das MeCAT-Mal-Reagenz mit einem bekannten, ebenfalls thiolreaktiven Reagenz verglichen. Um eine Neubildung von Disulfidbrücken nach der Reduktion zu verhindern, werden in der Proteomforschung häufig die Thiole blockiert. Dazu werden die Cysteine oftmals alkyliert, was häufig mit Iodacetamid geschieht.^[252] Diese Gruppe ist kleiner als das MeCAT-Mal-Reagenz und könnte eventuelle Größeneffekte der Markierungsreagenzien aufzeigen. Das Spektrum des alkylierten Antikörpers entspricht dem des markierten Antikörpers, nur dass die Verschiebung zu geringeren m/z -Verhältnissen kleiner ist, was der mit 58 Da deutlich geringeren Massendifferenz durch die Reaktion mit Iodacetamid entspricht (Abbildung 54). Im Unterschied zur MeCAT-Mal-Markierung kann jedoch nur eine Variante des halben Antikörpers detektiert werden. Im Gegensatz zum ausschließlich reduzierten Antikörper wird kein vollständiger Antikörper detektiert. Daraus kann geschlossen werden, dass die Reduktionen vollständig verliefen, allerdings kam es nur beim reduzierten Antikörper zu einer erneuten Zusammenlagerung der beiden Antikörperhälften aneinander. Diese Komplexbildung wird durch die Alkylierung bzw. die Markierung mit dem MeCAT-Mal-Reagenz verhindert.

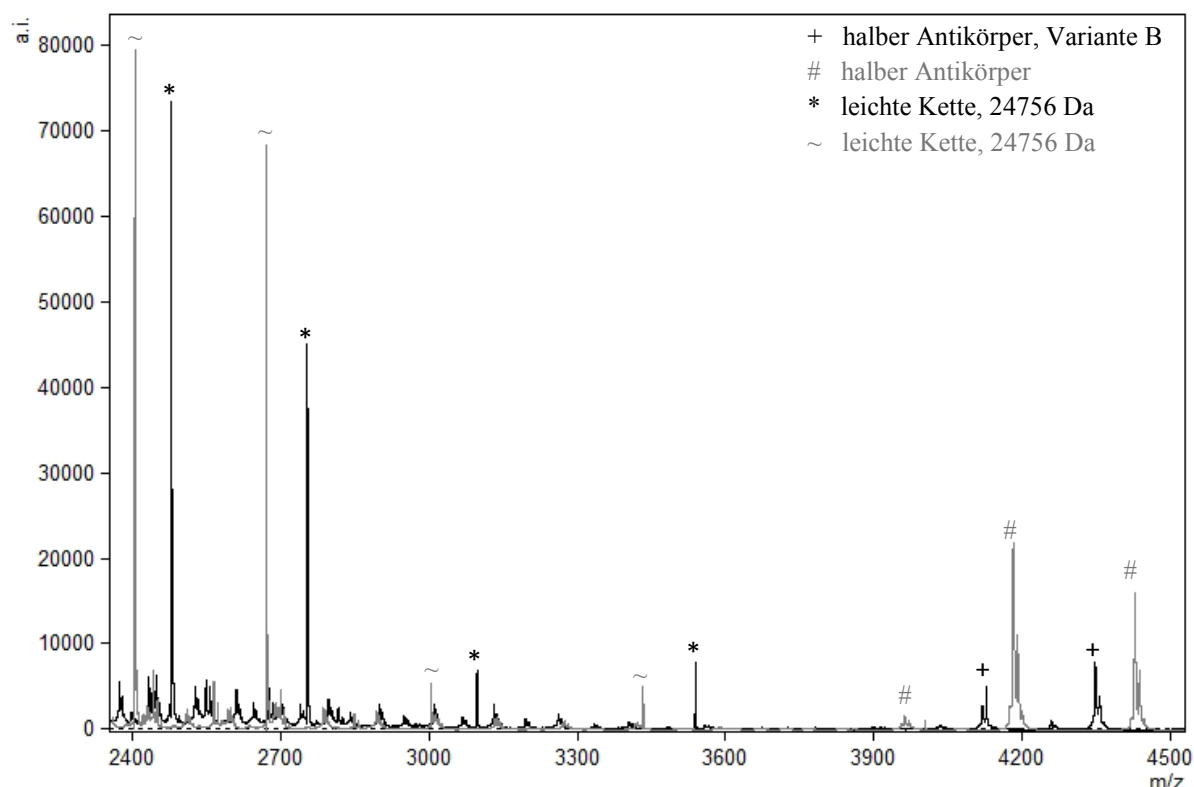


Abbildung 54: ESI-MS-Spektren des reduzierten und mit Iodacetamid alkylierten Anti-IL-8-Antikörpers. Es sind beispielhaft die Signale der leichten Kette und des halbierten Antikörpers des MeCAT-Mal markierten Antikörpers (schwarz) und des alkylierten Antikörpers (grau) gezeigt.

Tabelle 11: Überblick der Molekülmassen der einzelnen Anti-IL-8-Antikörperfragmente und der Massenunterschied durch die Markierung, die Masse des unmarkierten Antikörpers wurde durch Abzug der Masse der Alkylierungen vom entsprechenden Fragment erhalten.

	Masse des Fragments (alkylierter Anti-IL-8)	Masse des Fragments (markierter Anti-IL-8)	Massenunterschied
halbierter Antikörper	75.130,6 ± 8,2 Da	76.634,0 ± 6,3 Da (Variante A)	1503,4 Da
halbierter Antikörper	75.130,6 ± 8,2 Da	78.223,4 ± 6,9 Da (Variante B)	3092,8 Da
schwere Kette	51.051,3 ± 0,7 Da	53.458,1 ± 1,7 Da	2406,7 Da
leichte Kette	23.956,4 ± 0,1 Da	24.756,2 ± 0,1 Da	799,8 Da

Aus den berechneten Massen der alkylierten Fragmente wurden die Massen der nicht alkylierten Fragmente durch Abzug der Masse der Alkylierung gewonnen. Diese wurden nun mit den Massen des markierten Antikörpers verglichen und die Massenunterschiede berechnet (Tabelle 11). Da das Spektrum des alkylierten Antikörpers nur eine Signalserie für den halben Anti-IL-8-Antikörper aufweist, wurde von diesem der Massenunterschied zu beiden Varianten des halbierten, markierten Antikörpers und aus den Massenunterschieden anschließend der Markierungsgrad ermittelt (Tabelle 12). Es fällt auf, dass die errechneten Markierungsgrade in allen Fällen deutlich näher an ganzen Zahlen sind. So ist der Markierungsgrad der leichten Kette in diesem Fall eins und für die schwere Kette drei. Für den halben Antikörper gibt es je nach Variante einen Markierungsgrad von zwei oder vier. Bei dem vierfach markierten Fragment des Antikörpers (halbierter Antikörper, Variante B) muss auch eine intramolekulare Disulfidbrücke reduziert und markiert worden sein, da eine Reduktion in der Hinge-Region eines IgG1 Antikörpers nur eine zweifache Markierung ermöglicht. Des Weiteren ist die leichte Kette noch in diesem Fragment enthalten, sodass auch diese Disulfidbrücke nicht gespalten worden sein kann, es hätte außerdem auch nur eine weitere Markierung ermöglicht und nicht zwei. In welchem Teil diese intramolekulare Disulfidbrücke gespalten wurde, ist unklar, da weder für die leichte noch die schwere Kette entsprechende Hinweise gefunden wurden.

Tabelle 12: Überblick der Markierungsgrade der einzelnen Antikörperfragmente des markierten Anti-IL-8-Antikörpers, aus dem Vergleich des markierten und des alkylierten Antikörpers (siehe Tab. 16).

	Masse des Fragments (markierter Anti-IL-8)	Markierungsgrad
halbierter Antikörper	76.634,0 ± 6,3 Da	1,96
halbierter Antikörper	78.223,4 ± 6,9 Da	4,03
schwere Kette	53.458,8 ± 1,7 Da	2,91
leichte Kette	24.756,2 ± 0,1 Da	1,04

Abschließend zur Untersuchung der MeCAT-Markierungen lässt sich sagen, dass es durch die ESI-MS-Messungen möglich war, die Markierungsgrade in den einzelnen Fragmenten des Anti-IL-8-Antikörpers zu bestimmen. Allerdings zeigen sich dabei ungewünschte Produkte wie die leichten und schweren Ketten. Diese sind markiert, können aber keine Antigenbindungen mehr eingehen, da so eine Bindung des Antikörpers nur über das F_(ab)-Fragment erfolgen kann und dafür müssen leichte und schwere Kette kovalent aneinander gebunden sein. Da die Thiolgruppen jedoch durch die Markierungen blockiert sind, können sich die leichten und schweren Ketten nicht mehr zusammenlagern und somit keine Antigene binden. Die halbierten Antikörper konnten in unterschiedlichen Formen gefunden werden, diese sind auch weiterhin aktiv und somit bindungsfähig, was bereits in der Literatur für andere Antikörper beschrieben wurde.^[68] Der komplette Antikörper konnte weder markiert noch unmarkiert gefunden werden, was darauf hindeutet, dass die Reduktion nicht nach der Reduktion einer Disulfidbrücke in der Hinge-Region stoppt, sondern diese vollständig gespalten wird. Trotz dieser Befunde ist die MeCAT-Markierung von Antikörpern erfolgreich, da ein Antikörper über die F_(ab)-Fragmente an die Antigene bindet und somit auch ein in der Hinge-Region geteilter Antikörper aktiv ist. Die Verluste durch die Markierung der leichten und schweren Ketten müssen jedoch bei der Bestimmung der einzusetzenden Konzentration berücksichtigt werden. Darüber hinaus bedeuten die Unterschiede in den Markierungsgraden des halben Antikörpers, dass immer nur eine Mischung dieser betrachtet werden kann.

Neben der Markierung der Antikörper mit Metallen kann auch eine Iodierung der Aminosäuren Tyrosin und Histidin zur Quantifizierung genutzt werden. Die Aminosäuren können dabei je nach Reaktionsführung ein- oder zweimal iodiert werden (Abbildung 9). Darüber hinaus kann der Bindungsbereich des Protein A mit dem Antikörper identifiziert und

dabei herausgefunden werden, wie viele Tyrosine und Histidine an dieser Bindung beteiligt sind. Iodierungen werden üblicherweise mit Iod-Kaliumiodidlösungen durchgeführt. Um den Einfluss der Iodierung auf die Bindungsstelle zwischen Protein A und dem Anti-Interleukin-8 Antikörper untersuchen zu können, wurden beide Proteine zuerst einzeln iodiert und analysiert. Da es das Ziel ist, den Komplex aus Protein A und Anti-IL-8-Antikörper zu untersuchen, müssen die einzelnen Proteine analysiert werden. Das Protein A wurde mit Iod-Kaliumiodidlösungen iodiert und per ESI-MS gemessen. Ein Vergleich des iodierten Protein A mit dem nicht iodierten Protein A ist in Abbildung 55 dargestellt. Das iodierte Protein A zeigt eine ganze Serie von Signalen, die unterschiedliche Iodierungsgrade darstellen. Protein A weist sechs Tyrosine auf, die sich alle in den Bindungsdomänen befinden.^[153] Der Vergleich der unterschiedlichen Signalserien mit der Masse des nicht iodierten Protein A von $44600,4 \pm 14,6$ Da ergibt unterschiedlich stark iodierte Protein A Spezies (Tabelle 13). Die Unterschiede in den Iodierungen sind durch die jeweilige Zugänglichkeit der Tyrosine für die Iodierung erklärbar. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Konzentrationserhöhung des Iodierungsmittel zu einem höheren Iodierungsgrad führt, allerdings ergab in diesem Fall auch eine hohe Konzentration der Iod-Kaliumiodidlösungen keine vollständigen Iodierung.^[122] Eine Erhöhung der Temperatur würde zu einem höheren Iodierungsgrad führen, allerdings hätte dies zur Folge, dass es zu einer Denaturierung des Protein A kommen würde. Da jedoch gerade die Bindung des Protein A an den Antikörper von Interesse ist, wurden keine Versuche unternommen, den Iodierungsgrad zu erhöhen, die eine Denaturierung zur Folge hätten.

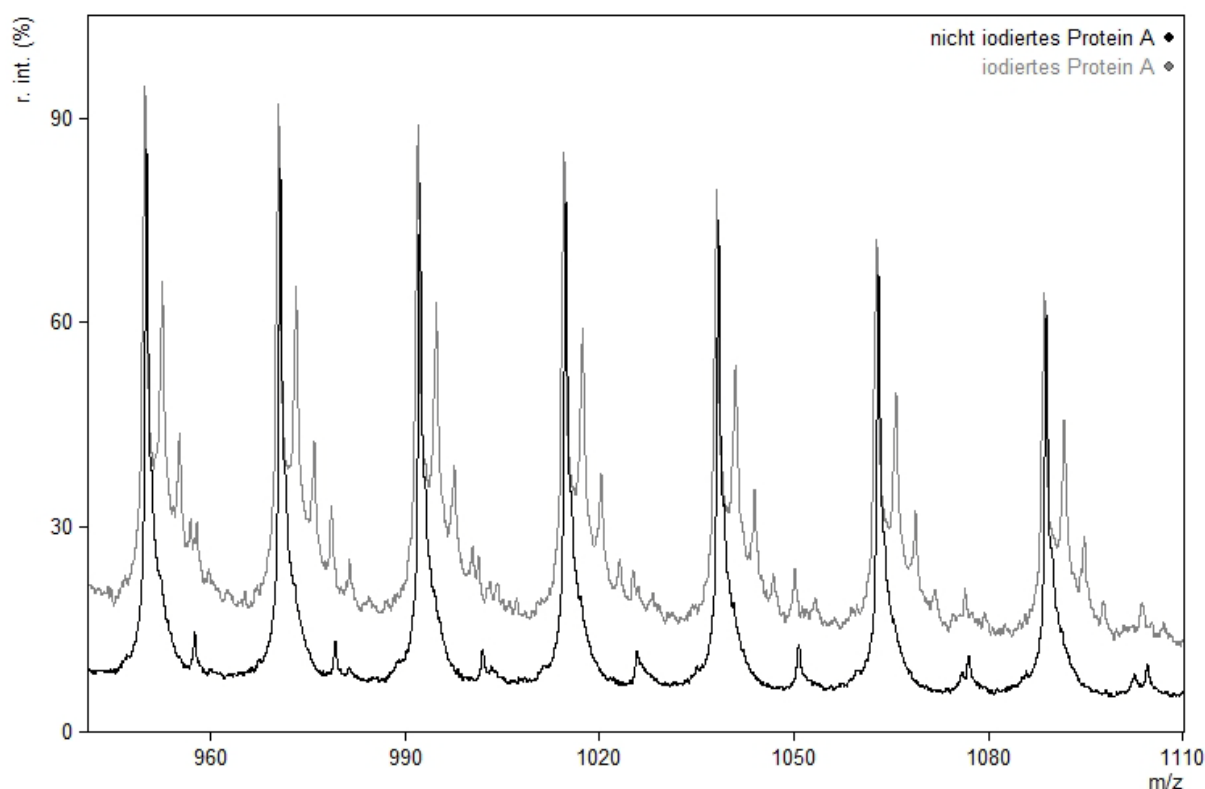


Abbildung 55: Vergleich der ESI-MS-Spektren des nicht iodierten (schwarz) und des mittels Iod-Kaliumiodid iodierten Protein A (grau) in 0,1 % FA gemessen, bei einer Kollisionsenergie von 10 eV.

Tabelle 13: Iodierungsgrade des Protein A nach der Iodierung mit Iod-Kaliumiodid.

Masse in Da	Differenz zum nicht iodierten Protein A in Da	Iodierungsgrad
$45.363,8 \pm 5,0$	763,4	6
$45.490,1 \pm 5,8$	889,6	7
$45.614,1 \pm 3,7$	1013,7	8
$45.737,9 \pm 3,5$	1137,5	9
$45.860,3 \pm 5,6$	1259,9	10

Der Anti-IL-8-Antikörper wurde ebenfalls mittels Iod-Kaliumiodid iodiert und mittel ESI-MS analysiert (Abbildung 56). Dabei konnte durch einen Vergleich mit dem nicht iodierten Antikörper der ungefähre Gehalt an Tyrosinen von 55 ermittelt werden. Eine genauere Bestimmung war nicht möglich, da es zu keiner vollständigen Iodierung kam und die unterschiedlichen Spezies sich überlagerten und somit keine genauere Bestimmung der Anzahl an Tyrosinen möglich war. Eine Analyse mittels ICP-MS wurde nicht durchgeführt, da diese nur zu einem mittleren Markierungsgrad geführt hätte, der keine Aussage über den tatsächlichen Iodierungsgrad zulässt. Die durchgeführten Messungen zeigten bereits

unterschiedliche Spezies, die verschiedene Markierungsgrade bedeuten, diese sind mittels ICP-MS jedoch nicht untersuchbar.

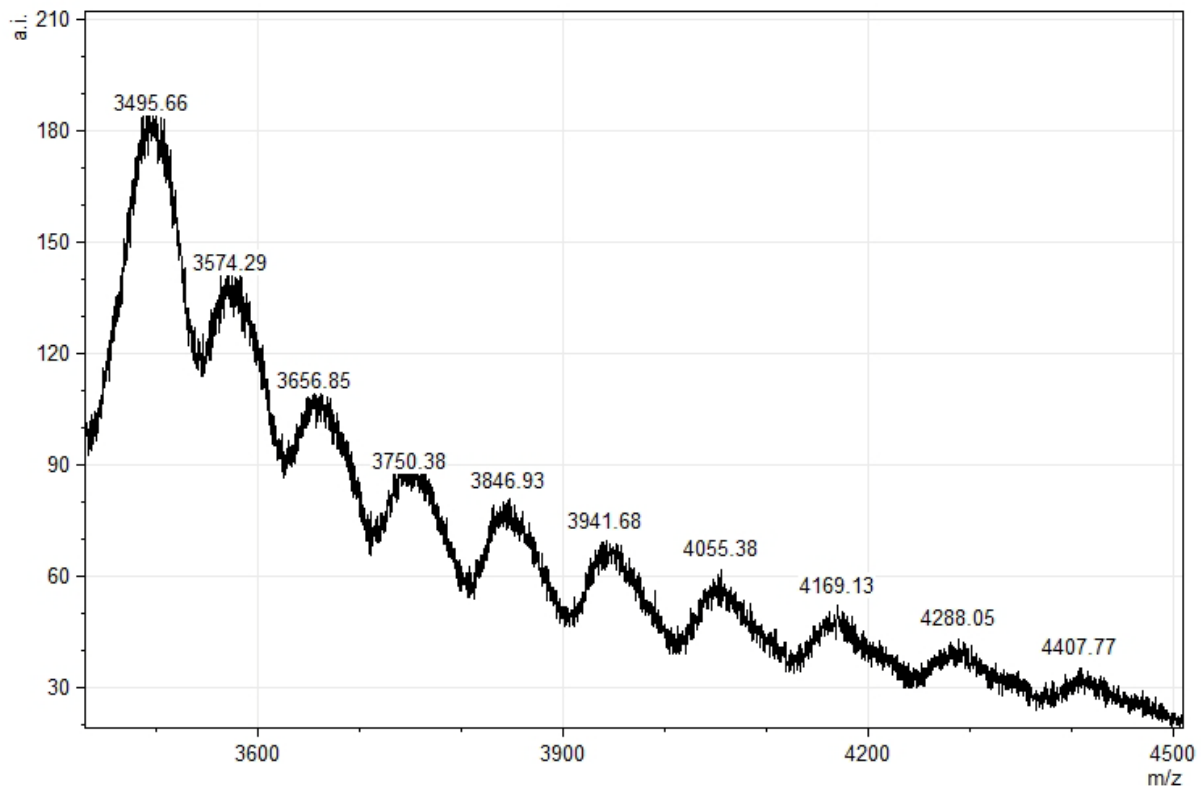


Abbildung 56: ESI-MS-Spektrum des mittels Iod-Kaliumiodid iodierten Anti-IL-8-Antikörpers in 0,1 % FA gemessen, bei einer Kollisionsenergie von 15 eV.

Zur Reduktion der Komplexität der Spektren wurde eine Proteolyse mit Papain durchgeführt und anschließend iodiert. Da es das Ziel war, die Protein A Bindungsstelle zu untersuchen, war Papain die logische Wahl, weil es diese intakt lässt. Trotz der sehr zuverlässigen Proteolyseprotokolle konnten in den ESI-MS-Messungen keine Signale des F_c -Fragmentes erhalten werden. Um zu überprüfen, ob die Iodierung nach der Proteolyse das Problem ist, wurde in einem weiteren Ansatz erst iodiert und anschließend mittels Papain proteolysiert. Auch in diesem Ansatz konnten in den ESI-MS-Messungen keine zuordenbaren Signale gefunden werden. Es scheint so, als wenn die Iodierung die Wechselwirkungen zwischen den Ketten zerstört und somit das F_c -Fragment zerfällt. Da auch keine anderen Fragmente oder sogar der komplette Antikörper in den Spektren gefunden werden konnten, kann davon ausgegangen werden, dass die Proteolyse stattgefunden hat. Die Messung des kompletten iodierten Antikörpers per MALDI-MS zur Bestimmung des Iodierungsgrades ist keine Alternative, da die Auflösung in diesen Massenbereichen um 150 kDa zu schlecht ist, um die kleinen Unterschiede der einzelnen Iodierungen erkennen zu können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Iodierung auch für Antikörper anwendbar ist. Allerdings ist unklar, inwieweit diese vollständig verläuft, da die Auflösung des High Mass ESI-Q-ToFs nicht ausreichend ist, um unterschiedliche Iodierungsgrade aufzuklären. Die Iodierung scheint jedoch zu einer Denaturierung zu führen, somit ist dies keine Methode, um Wechselwirkungen von nicht kovalenten Komplexen zu untersuchen. Durch die Spezifität der Iodierung kann diese Methode allerdings prinzipiell dazu dienen, Tyrosine und Histidine zu markieren. Allerdings kann eine Quantifizierung nicht erfolgen, da keine vollständige Iodierung erreicht werden konnte.

Antikörperkomplexe

Mit den schonenden Ionisierungseigenschaften des High-Mass Q-ToF ist es möglich, auch nicht kovalente Komplexe zu messen.^[108] Dies ist vor allem für die nachfolgenden Untersuchungen mit den polymerbasierten Trennmaterialien wichtig. Dafür wurde der Anti-IL-8-Antikörper mit dem Antigen im entsprechenden Puffer inkubiert, der Überschuss an Antigen mittels Cut-Off-Zentrifugenfiltern entfernt und der Komplex mit ESI-MS analysiert. Dabei werden Signale detektiert, die mit einer Masse von $157875,2 \pm 55,88$ Da dem Antigen-Antikörper-Komplex zugeordnet werden können. Bei einer Erhöhung der Kollisionsenergie von 10 auf 50 eV werden die Signale schärfer und es bilden sich neuere heraus (Abbildung 57). Die Erhöhung der Kollisionsenergie führt zur Dissoziation des Komplexes und es können neben diesem auch das Antigen ($8371,26 \pm 0,72$ Da) und der Antikörper ($150032,4 \pm 46,36$ Da) detektiert werden. Ein Komplex mit zwei gebundenen Antigenen konnte in diesen Messungen nicht gefunden werden. In einer Vergleichsmessung mit einem MALDI-ToF (Reflex III, Bruker, Deutschland) wurde ebenfalls dieser Komplex in einer DHB-Matrix analysiert (Abb. 70). Der intakte Komplex konnte nicht gemessen werden, allerdings ist dies nicht erstaunlich, da nicht kovalente Komplexe mit MALDI-MS nur selten intakt bleiben und dann auch nur in geringen Intensitäten detektiert werden können.^[253] Jedoch liefert diese Messung einen Hinweis auf den vorher intakten Komplex, da durch die Reinigung mittels 50 kDa Cut-Off kein freies, ungebundenes Interleukin-8 mehr vorhanden sein kann.

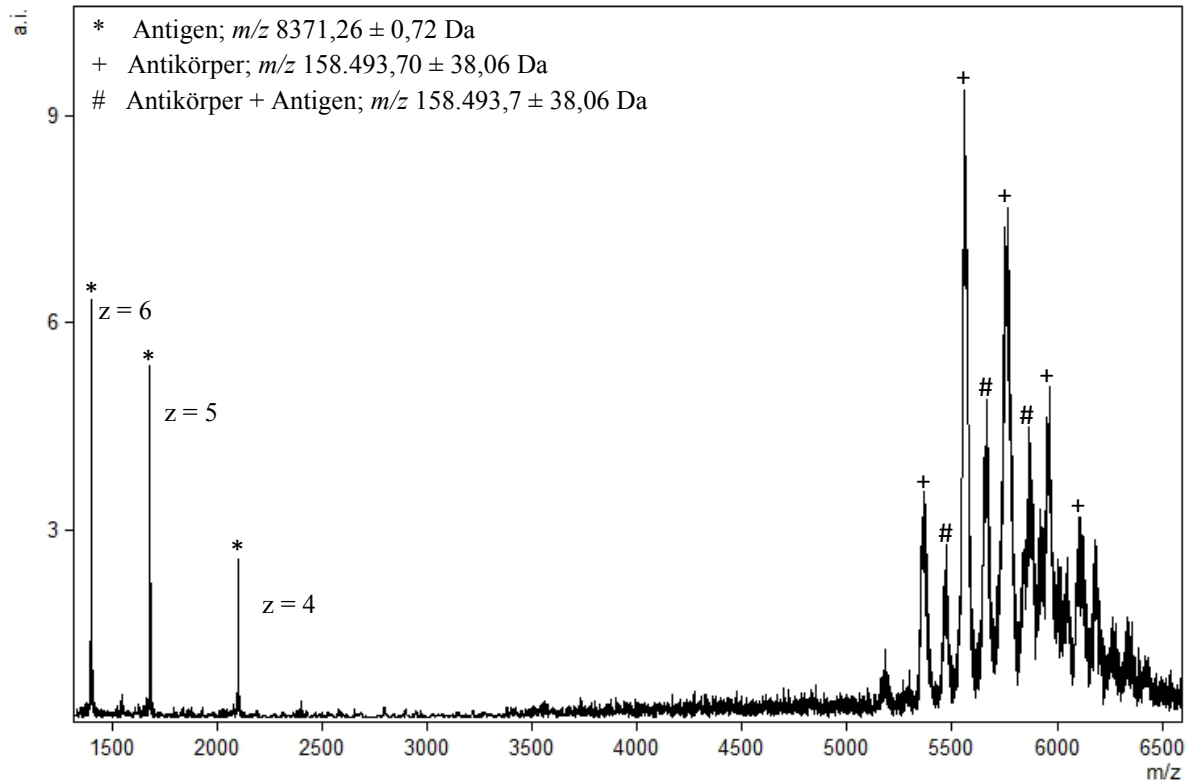


Abbildung 57: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers/IL-8-Komplexes in 200 mM Ammoniumacetat, Kollisionsenergie 50 eV.

Für die Abbildung 58 wurden zwei Spektren aus der gleichen Messreihe kombiniert, da das eingesetzte Gerät nur feste Messbereiche erlaubt und somit kleine und große Massen nicht in einer Messung ermittelt werden können. Analog zu dem Antigen-Antikörper-Komplex wurde, im Hinblick auf die Nutzung von Protein A-Säulen, auch versucht, den entsprechenden Komplex mittels ESI-MS zu detektieren. Um diesen Komplex möglichst gut detektieren zu können, wurde dieser in Triethylammoniumacetat analysiert (Abbildung 59). Auch bei niedrigen Kollisionsenergien sind intensive Signale des freien Protein A zu erkennen, was darauf hindeutet, dass dieser Komplex nicht so stabil ist wie der Antigen-Antikörper-Komplex. Die Affinitätskonstanten der verschiedenen Domänen des Protein A zu IgG Antikörpern liegen zwischen $2,6$ und $14 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{-1}$,^[254] dagegen beträgt die Affinitätskonstante des Interleukin-8 zum Anti-IL-8-Antikörpers 10^{-22} M^{-1} .^[85] Trotz dieser deutlichen Unterschiede in den Affinitäten konnte auch der intakte Protein A-Antikörper-Komplex detektiert werden.

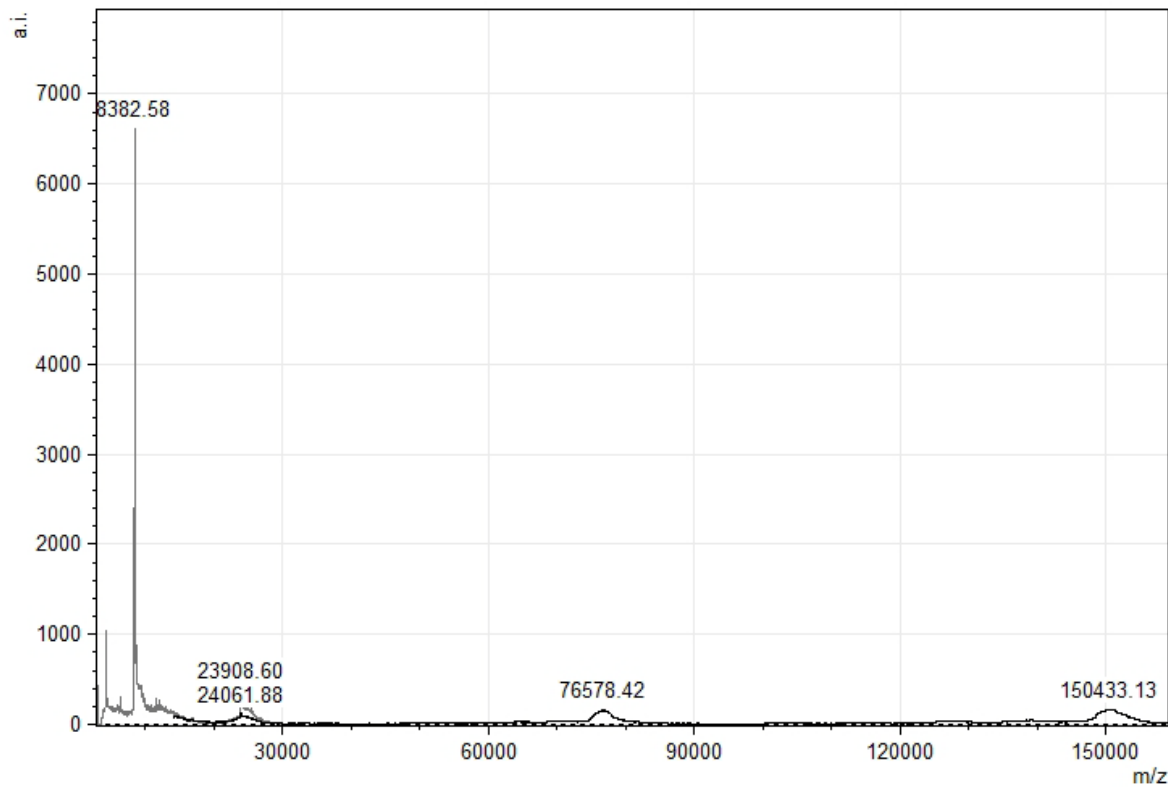


Abbildung 58: Kombiniertes MALDI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers/IL-8-Komplexes in DHB Matrix, unterer Massenbereich (grau) und oberer Massenbereich (schwarz).

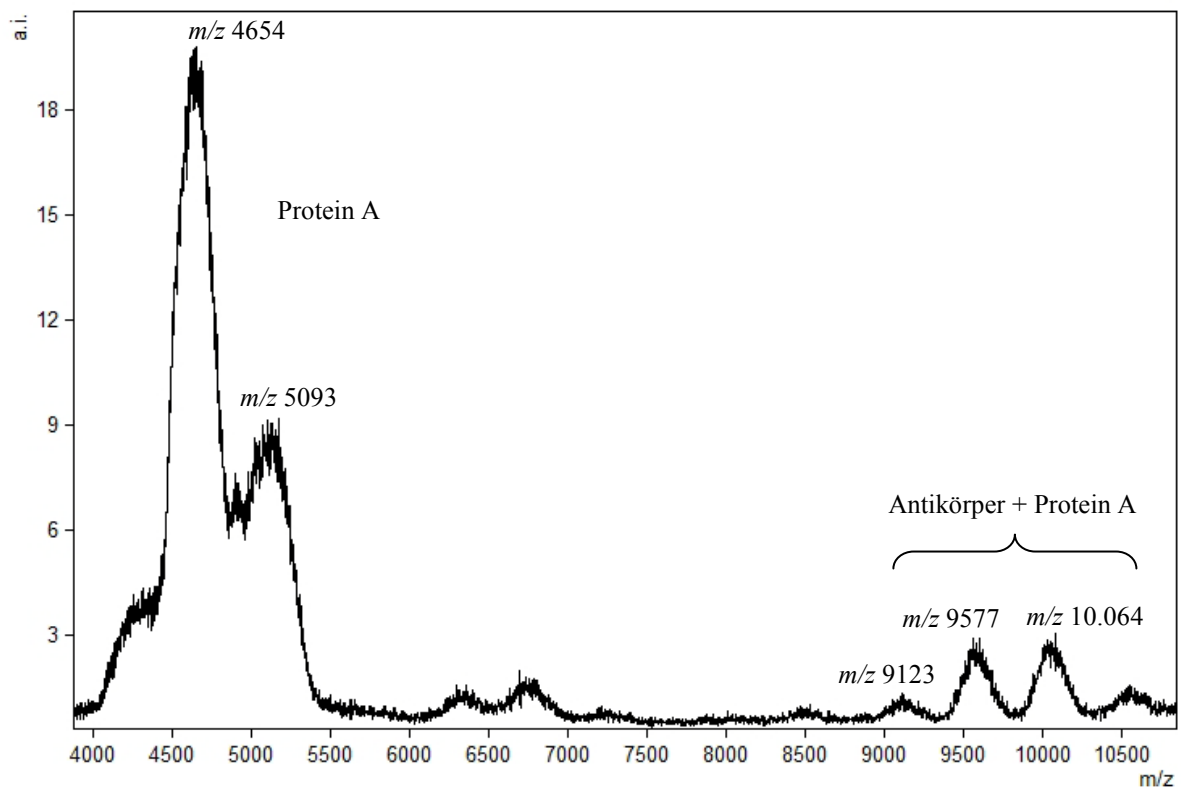


Abbildung 59: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8/Protein A-Komplexes in 200 mM Triethylammoniumacetat.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass es nicht nur möglich ist, Antikörperoligomere mittels ESI-MS zu messen, sondern auch nicht kovalente Komplexe mit anderen Proteinen, wobei sich die Affinitäten und somit die Stabilitäten der Komplexe sehr deutlich unterscheiden.^[85, 254] Da es nun möglich ist, auch relativ labile, nicht kovalente Komplexe zu analysieren, sollte es möglich sein, auch Antikörper-Polymer-Komplexe zu messen. Da in den vorangegangenen Untersuchungen auch verhältnismäßig kleine Massenunterschiede bestimmt werden konnten, könnten so auch kleine Polymere analysiert werden. Diese Befunde waren die Motivation für die nachfolgenden Untersuchungen.

5.2 Polymerbasierte Trennmaterialien

Für die Anwendung von Antikörpern im medizinischen Bereich, wie diagnostische oder therapeutische Zwecke, sind sehr hohe Reinheitsgrade dieser Antikörper notwendig. Diese werden durch zahlreiche Aufreinigungsschritte sichergestellt. Aktuelle Untersuchungen beschäftigen sich mit der Verwendung von Polymeren zur Affinitätsaufreinigung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten entsprechende Polymermaterialien untersucht werden, wobei die nicht kovalenten Wechselwirkungen der Antikörper mit den Polymeren dabei im Vordergrund standen.

5.2.1 Protein A mimetische Polymere

Untersuchung der Polymere

Zur Charakterisierung der Polymere wurden die Feld-Fluss-Fraktionierung (FFF) und die dynamische Lichtstreuung (DLS) verwendet. Die eingesetzten Protein A mimetischen Polymere (Abbildung 10 und Abbildung 11) wiesen laut GPC-Messungen in der Gruppe von Prof. Schrader eine Molmasse von 83 kDa (Polymer 10) und 120 kDa (Polymer 13) auf.

Das Fraktogramm des Polymers 10 zeigt zwei Signale beim Brechungsindex und somit zwei verschiedene Größenverteilungen (Abbildung 60, graue Signale). Das erste Signal hat eine schmale Verteilung und auch eine geringe Lichtstreuung (schwarze Signale), was auf kleine Partikel bei hoher Konzentration hindeutet. Beim zweiten Signal ist fast keine Intensität im UV-Signal mehr zu erkennen, dafür ist die Verteilung breit und auch das Lichtstreusignal intensiv, was auf große Partikel bei geringer Konzentration hinweist. Aus den Messungen in der Gruppe von Prof. Schrader wurde allerdings nur ein Signal erwartet. Das Polymer 13 weist eine einzelne breite Verteilung auf, dieses Signal lässt eine große Ähnlichkeit zu BSA erkennen, was auf eine ähnliche Größe schließen lässt. Dies widerspricht jedoch den erwarteten Werten von 120 kDa.

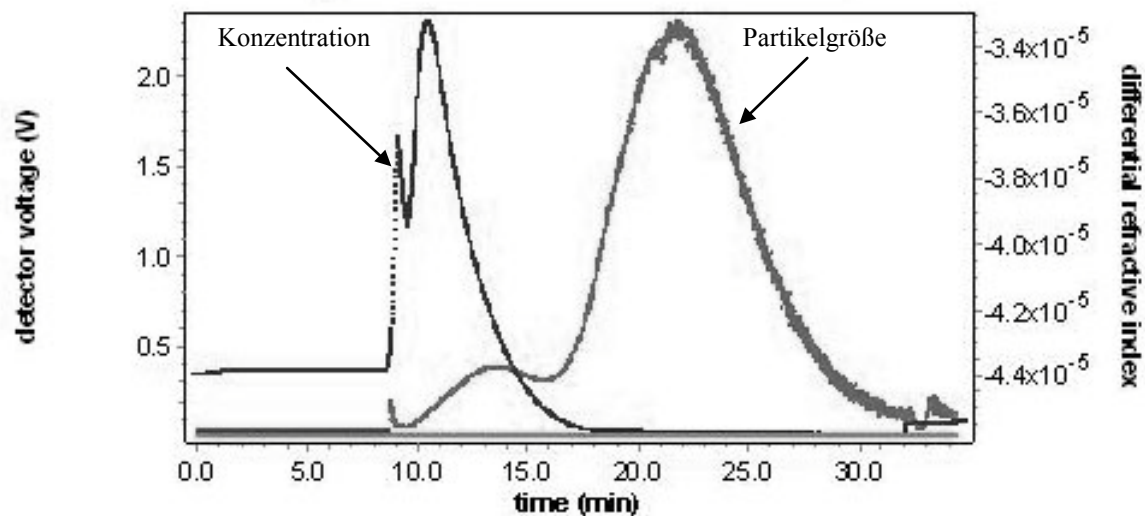


Abbildung 60: Fraktogramm des Polymers 10, zeitaufgelöste Messung des Brechungsindex (Partikelgröße; grau) und der Lichtstreuung (Konzentration; schwarz).

Die DLS Messungen wurden anzahl- und intensitätsgewichtet analysiert, wobei aus den anzahlgewichteten die Konzentration bestimmt werden kann. Beim Polymer 10 wurden Partikel mit einem Durchmesser von etwa 8,5 nm im Falle der anzahlgewichteten Darstellung gefunden (Abbildung 61). Die intensitätsgewichtete Darstellung zeigt mehrere Signale mit unterschiedlichen Durchmessern (12,6 nm, 97,6 nm und 2052 nm), wie es in Abbildung 62 zu sehen ist. Dabei ist die Verteilung um 97,6 nm sehr groß und hat auch mit Abstand die größte Intensität. Jede dieser Verteilungen stellt eine Fraktion in diesem Polymer da. Diese reichen in ihrer Größe von etwas über BSA (2,7 nm Durchmesser) bis hin zu sehr großen Partikeln. Die Partikel mit der größten Konzentration (8,5 nm) machen den überwiegenden Anteil des Polymers aus und haben eine Masse von ungefähr 200 kDa. Das Polymer 13 weist Partikel mit einem Durchmesser von 3,2 nm auf, was einer Masse von 80 kDa entspricht. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 14 dargestellt, wobei die sehr großen Partikel des Polymers 10 nicht aufgeführt wurden, da für diese keine Masse bestimmt werden konnte. Es zeigt sich, dass die durch die GPC erhaltenen Werte nicht mit denen der DLS übereinstimmen. Die FFF-Messungen sprechen eher für die Ergebnisse der DLS als für die Daten der GPC aus der Gruppe von Prof. Schrader.

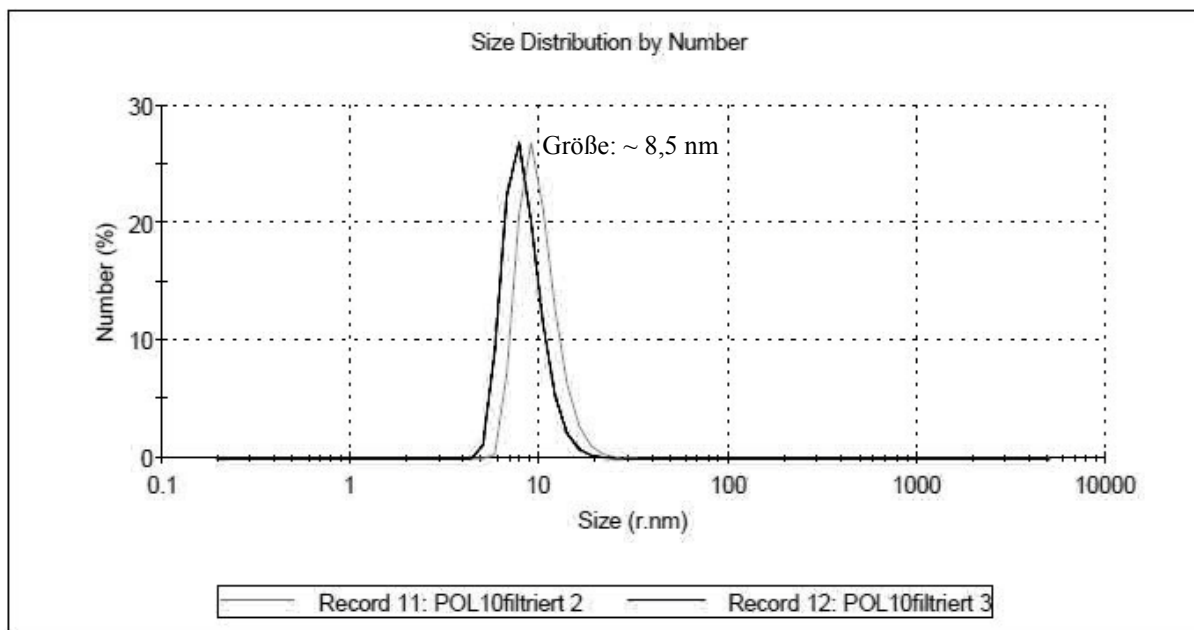


Abbildung 61: DLS-Messung des Polymer 10, anzahlgewichtete Darstellung, zweifach Messung.

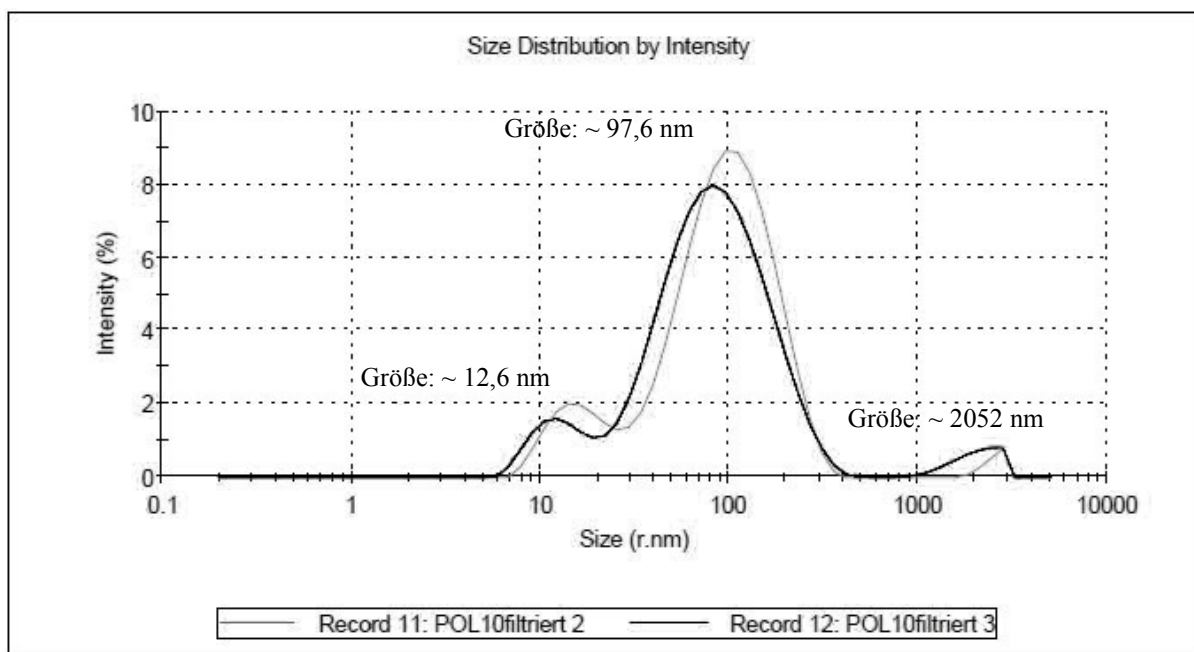


Abbildung 62: DLS-Messung des Polymer 10, intensitätsgewichtete Darstellung, zweifach Messung.

Tabelle 14: Massen der untersuchten Polymere.

	Vorhergesagte Masse in kDa	Gefundene Masse nach DLS in kDa	Größen nach FFF
Polymer 10	83	200	größer als BSA
Polymer 13	120	80	„ähnliche“ Größe wie BSA

Es wurde noch ein weiteres Polymer, das Polymer 10.1, mittels FFF und DLS untersucht. Wie in Abbildung 63 zu sehen ist, zeigt auch das Polymer 10.1 zwei Verteilungen im Fraktogramm, wie sie bereits beim Polymer 10 zu sehen waren. Die ermittelte Partikelgröße der kleinen Partikel liegt mit 3,5 nm etwas über der von BSA, die großen Partikel liegen zwischen 100 und 400 nm. Die Konzentration an kleineren Partikeln ist auch wieder deutlich höher als bei den größeren Partikeln und die Masse entspricht mit etwa 200 kDa der des Polymers 10.

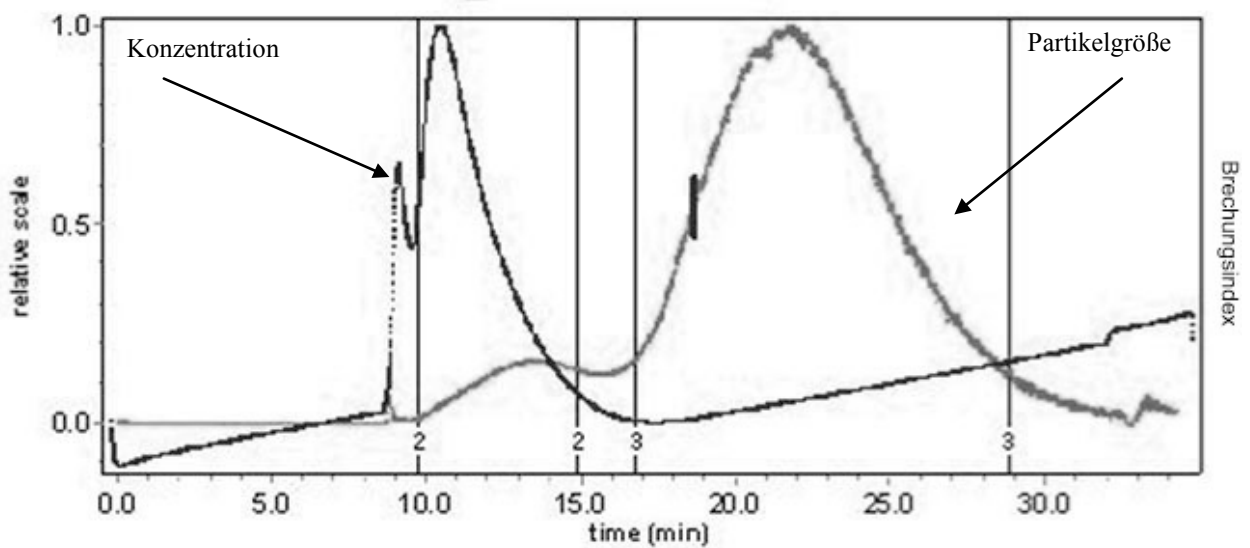


Abbildung 63: Fraktogramm des Polymers 10.1, zeitaufgelöste Messung des Brechungsindex (grau) und der Lichtstreuung (schwarz).

In den DLS Messungen zeigen sich zwei Verteilungen, eine bei 28 nm Partikeldurchmesser und eine bei 270 nm (Abbildung 64). Die Intensität des zweiten Peaks ist deutlich höher als die des ersten. Allerdings kann bei einer volumengewichteten Darstellung gezeigt werden, dass der Anteil der kleineren Partikel deutlich höher ist und bei über 80 % liegt, dies ist in Abbildung 82 (Anhang) zu sehen.

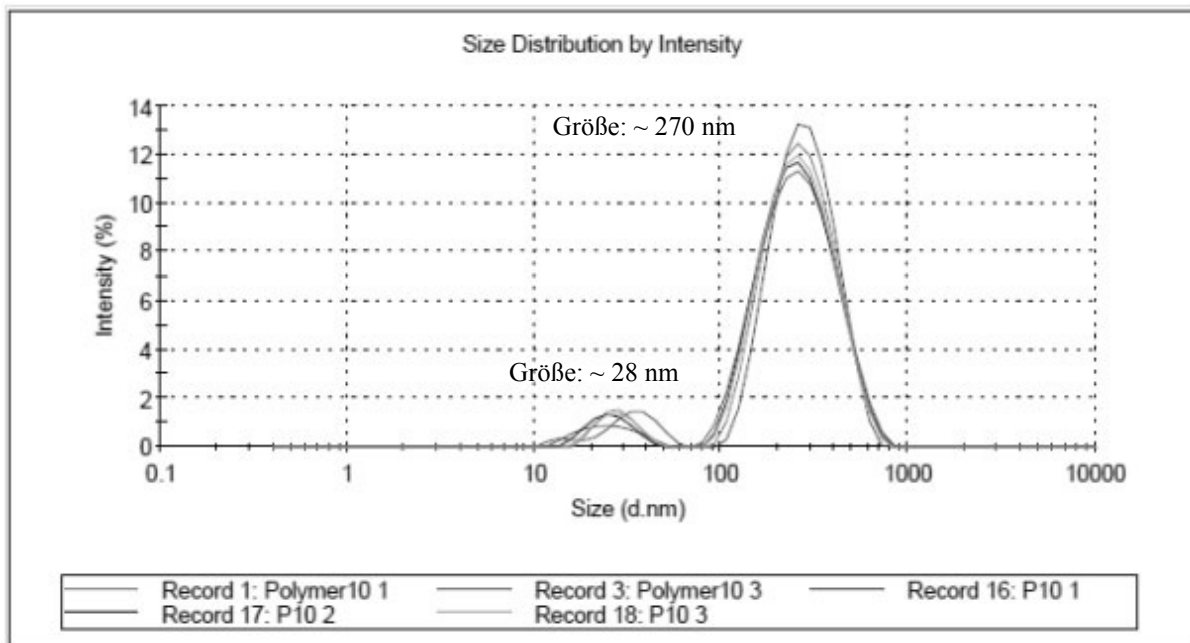


Abbildung 64: DLS-Messung des Polymers 10.1, intensitätsgewichtete Darstellung.

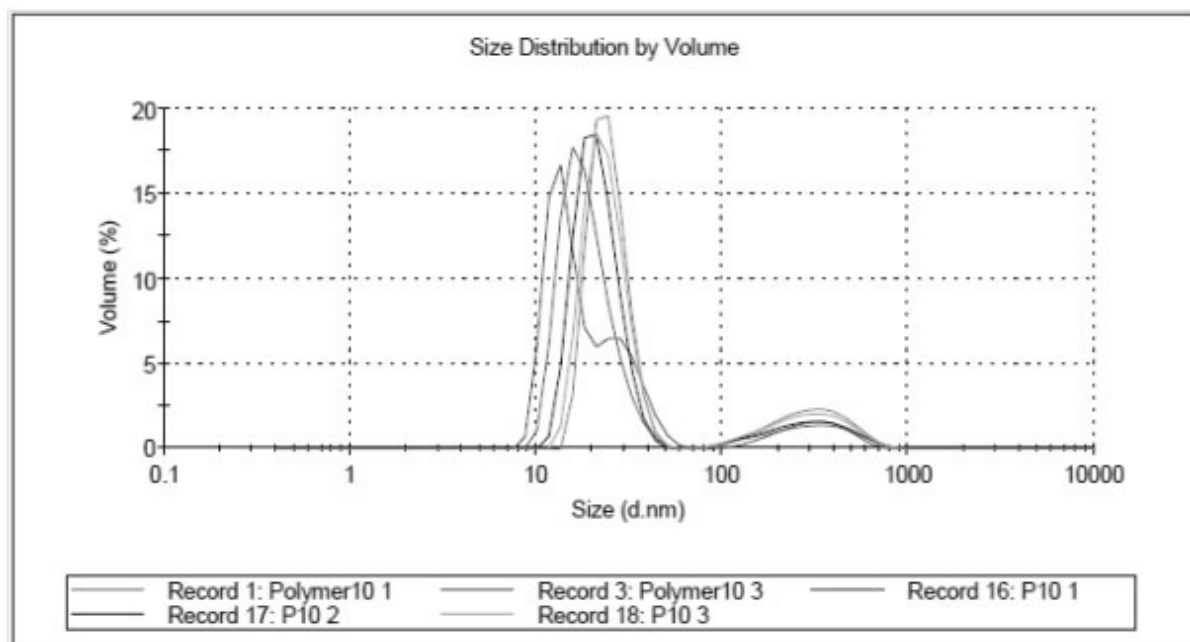


Abbildung 65: DLS-Messung des Polymers 10.1, volumengewichtete Darstellung.

Massenspektrometrische Analysen der Polymere waren aufgrund der Komplexität und Anzahl der unterschiedlichen Monomere und der Größe der Polymere nicht möglich.

Untersuchung der Polymer-Antikörper-Wechselwirkungen

Für die Untersuchung des Komplexes aus Anti-Interleukin-8 und Polymer 10.1 wurde nach einer Vorschrift aus der Gruppe von Prof. Schrader durch Inkubation des Polymers mit dem Antikörper der Komplex in einem PBS Puffer hergestellt und mittels FFF und DLS analysiert.

Ein Vergleich der Fraktogramme des Polymers, des Antikörpers und der Mischung ist in Abbildung 66 dargestellt. Deutlich sind die Signale des Antikörpers und des Polymers der reinen Substanzen zu erkennen, diese lassen sich auch in der Mischung wiederfinden. Nicht zu identifizieren ist jedoch das Signal des Antikörper-Polymer-Komplexes. Auch der Vergleich mit den DLS-Messungen zeigt den gleichen Befund (Abbildung 67). Die ermittelten Partikeldurchmesser sind 16 nm, 30 nm und 270 nm und können dem Anti-IL-8-Antikörper und dem Polymer zugeordnet werden, Signale des Komplexes werden nicht gefunden. Der Grund dafür kann verschiedene Ursachen haben, die wahrscheinlichste ist, dass sich der Komplex nicht gebildet hat. Ein weiterer könnte auch sein, dass sich nur eine sehr geringe Menge des Komplexes gebildet hat und dessen Signale so schwach sind, dass diese durch die Signale der Einzelsubstanzen überlagert werden.

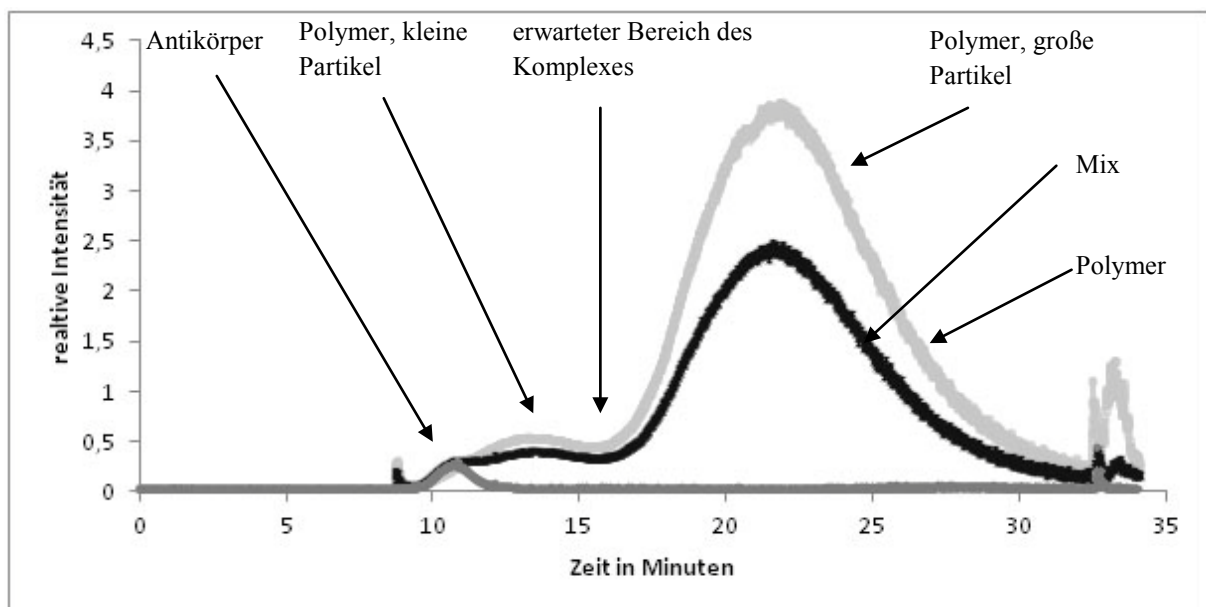


Abbildung 66: Vergleich der Fraktogramme des Polymers 10.1 (hellgrau), Antikörpers (dunkelgrau) und der Mischung (schwarz).

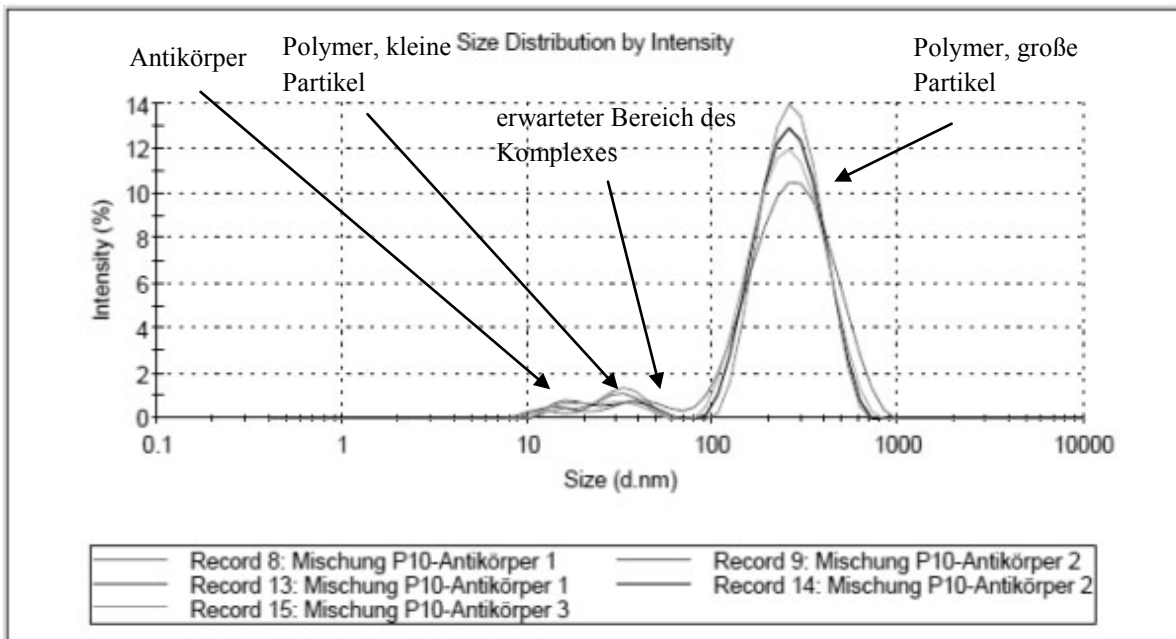


Abbildung 67: DLS-Messung des Polymer-Antikörper-Gemisches, intensitätsgewichtete Darstellung.

Die Untersuchungen des an Polymeren oder Membranen immobilisierten Anti-IL-8-Antikörpers erfolgten durch Reduktionen und tryptische Proteolysen und anschließende massenspektrometrische Analysen. In keinem der Fälle konnten Fragmente des Antikörpers nachgewiesen werden. Für diese Polymere waren FFF und DLS-Analysen nicht möglich. Weitere mögliche Analysestrategien beinhalten die Markierung der Antikörper mit Iod oder mit Metallen und anschließende ICP-MS-Analysen. Auf diese Weise könnte nachgewiesen werden, inwieweit der Antikörper an die Polymere und Membranen bindet. Leider waren diese Untersuchungen auf Grund von fehlendem Polymer- und Membranmaterial durch Beendigung des Projektes bei dem Projektpartner nicht mehr möglich.

5.3 Antikörperquantifizierung mittels ICP-MS und Schwefelgehalt

Da die bisher eingesetzten Quantifizierungsverfahren für Antikörper alle nicht direkt auf Primärstandards rückführbar sind, war es ein weiteres Ziel, eine rückführbare Quantifizierungsmethode zu entwickeln. Dabei sollte die Quantifizierung mittels Messung des Schwefelgehaltes per ICP-MS erfolgen. Der Hintergrund für diesen Ansatz sind Arbeiten in der Gruppe von Prof. Gunda Köllensberger (Universität für Bodenkultur Wien/Universität Wien), in denen Quantifizierungen von Proteinen mittels Bestimmung des Schwefelgehaltes per ICP-MS durchgeführt wurden.^[255] Teil dieser Arbeiten war auch die Bestimmung der Konzentrationsbestimmung der beiden schwefelhaltigen Aminosäuren mittels ICP-MS-Messungen.^[12] Für diese Untersuchungen wurde ebenfalls der Anti-Interleukin-8-Antikörper eingesetzt.

5.3.1 Bestimmung des Verhältnisses von Methionin und Cystein

Um eine Quantifizierung über den Schwefelgehalt durchführen zu können, muss die Anzahl an Schwefelatomen pro Antikörpermolekül bekannt sein. Dies ist jedoch beim Anti-IL-8-Antikörper bisher nicht der Fall, weshalb die Bestimmung der Anzahl der Cysteine und Methionine als erster Arbeitsschritt notwendig wurde. Als Referenz wurde das Protein Lysozym eingesetzt, das zwei Methionine und acht Cysteine enthält.

Um die Anzahl der Cysteine und Methionine bestimmen zu können, konnte durch einen Vergleich mit Literaturangaben die Zahl der Cysteine bestimmt werden.^[23, 24] Dies ist durch die strukturelle Gleichheit der Antikörper innerhalb einer Klasse möglich. Da durch den Literaturvergleich die Anzahl an Methioninen jedoch nicht bestimmt werden kann, muss diese durch eine ICP-MS-Analyse in Relation zum Gehalt an Cysteinen ermittelt werden. Durch die bekannte Anzahl an Cysteinen lässt sich somit auch die Anzahl an Methioninen im Antikörper bestimmen. Für die Messungen wurde der Antikörper mit frisch hergestellter Perameisensäure hydrolysiert und oxidiert. Durch die Oxidation des Cysteins entsteht Cysteinsäure und Methionin wird zu Methioninsulfon oxidiert (Abbildung 68). Die beiden gebildeten Oxidationsprodukte der Aminosäuren lassen sich nun durch den Einsatz von starken Anionenaustauschersäulen trennen und anschließend mittels ICP-MS über den Schwefelgehalt quantifizieren.

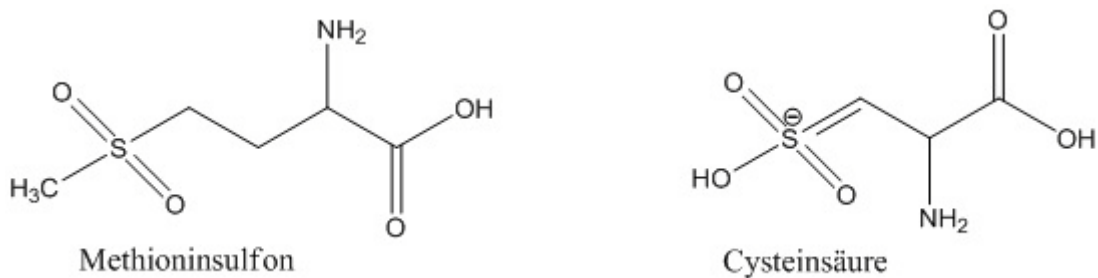


Abbildung 68: Oxidierte Formen der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein.

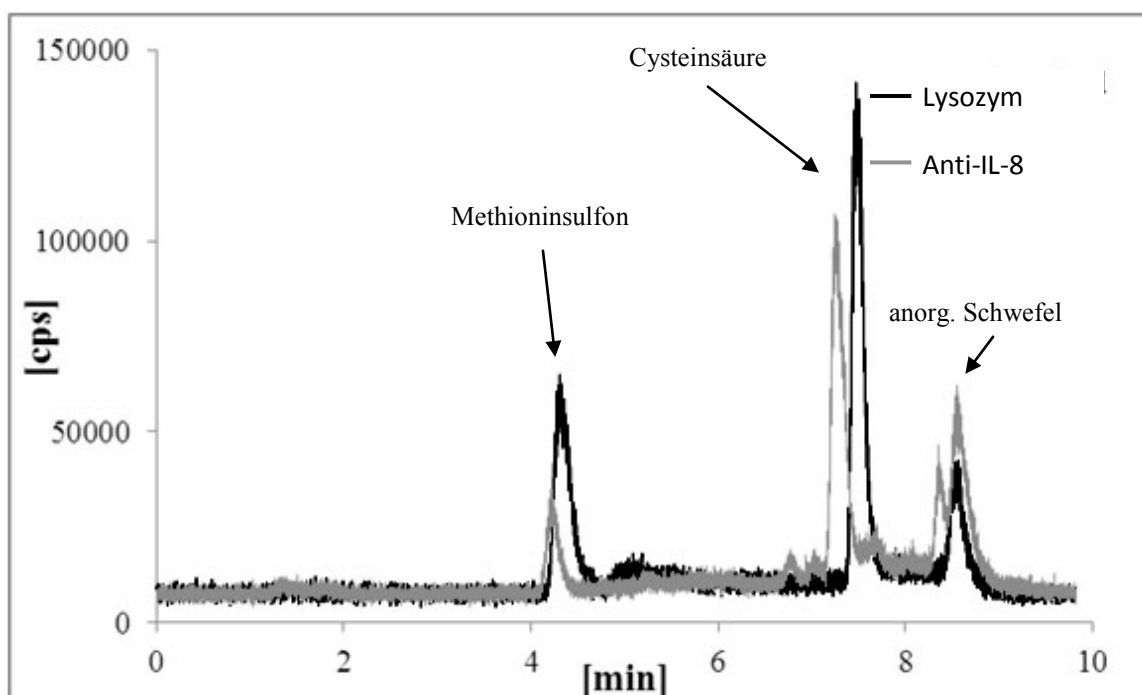


Abbildung 69: Vergleich der LC-ICP-MS-Chromatogramme des hydrolysierten Lysozymstandards (schwarz) und des hydrolysierten Anti-Interleukin-8-Antikörpers (grau).

Die HPLC-ICP-MS-Analyse des hydrolysierten Lysozymstandards zeigt zwei Peaks (Abbildung 69, schwarz). Der erste Peak bei 4,5 min kann dem Methioninsulfon zugeordnet werden und der zweite bei 7,5 min der Cysteinsäure, die Zuordnung erfolgt über die Retentionszeiten der Reinsubstanzen. Der letzte Peak stammt von anorganischen Schwefelverunreinigungen, die von der Probenvorbereitung herrühren.^[12] Die Hydrolyse des Antikörpers zeigt noch einige weitere Signale, die auf eine nicht vollständig verlaufende Oxidierung hindeuten (Abbildung 69, grau). Trotzdem konnten die Konzentrationen der beiden Aminosäuren bestimmt werden. Es wurde in der Antikörperlösung eine Cysteinkonzentration von 490 ± 18 nmol/mL ermittelt und für das Methionin eine Konzentration von 170 ± 6 nmol/mL. Aus dem Verhältnis beider Konzentrationen zueinander lässt sich ein Cystein zu Methionin Verhältnis von 2,9 errechnen. Dies bedeutet bei 32

Cysteinen, dass 11 Methionine vorhanden sind und somit der Anti-IL-8-Antikörper 43 Schwefelatome beinhaltet.

5.3.2 Antikörperquantifizierung mittel ICP-MS

Mit der nun bekannten Anzahl an Schwefelatomen ist es möglich, die Konzentration des Anti-IL-8-Antikörpers zu bestimmen. In den folgenden ICP-MS-Messungen zur Konzentrationsbestimmung wurden Myoglobin (2 Schwefelatome) und HSA (41 Schwefelatome) als Referenz verwendet. Für die ersten Analysen wurde ein ELAN DRC II (Perkin Elmer, USA) verwendet. Mit diesem wurden Messungen mittels SEC und auch einfache Fließinjektionsanalysen (FIA) der Lösungen der Reinsubstanzen durchgeführt. Die SEC hat den Vorteil, dass eventuelle Verunreinigungen oder Nebenprodukte, wie z.B. denaturierter Antikörper, vom reinen Antikörper getrennt werden können, während bei der FIA eine höhere Geschwindigkeit und höhere Wiederfindungsraten zu erwarten sind. Da die einzelnen Proteine einen unterschiedlichen Gehalt an Schwefelatomen aufweisen, muss die Konzentration der Standards auf den Schwefelgehalt umgerechnet werden (siehe Schwefelkonzentrationsberechnung, Anhang).

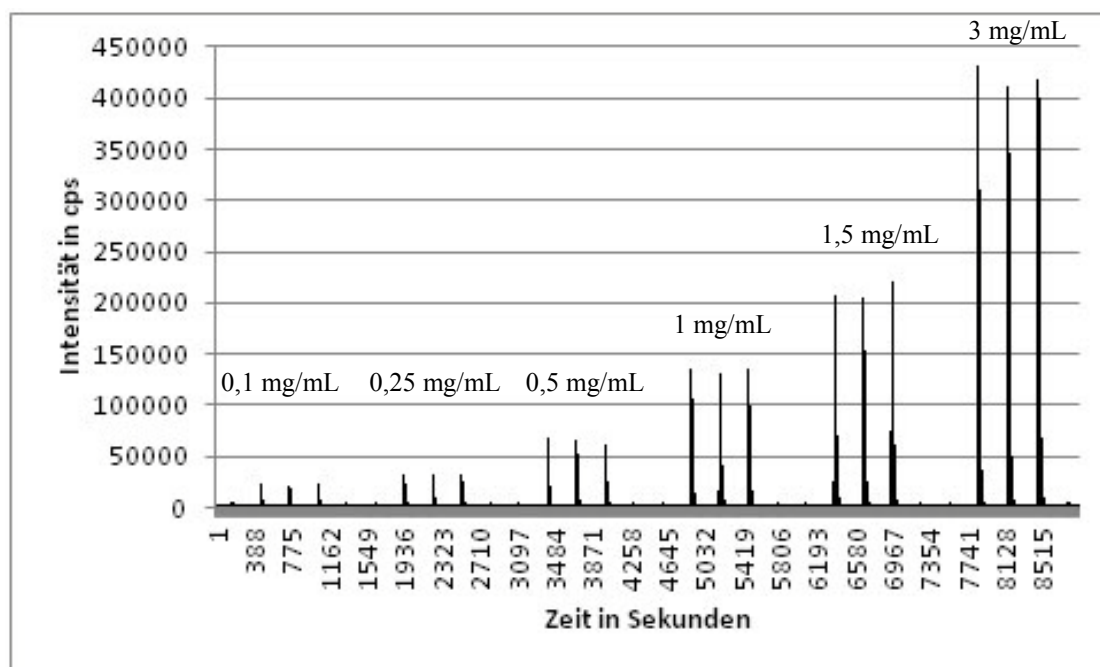


Abbildung 70: Intensitätsprofil der ICP-MS Messung ($m/z = 48$; $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$) der FIA von Myoglobin in unterschiedlichen Konzentrationen. Es handelt sich um jeweils drei Injektionen des jeweiligen Standards und zwei sich anschließende Blankinjektionen, wobei die Konzentrationen 0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,5 und 3 mg/mL betragen. (ELAN DRC II).

In Abbildung 70 ist exemplarisch das Intensitätsprofil der ICP-MS-Messung von Fließinjektionen von Myoglobin zu sehen. Aus den Peakflächen der verschiedenen Konzentrationen konnte nun eine Kalibrierkurve erstellt werden, genau wie bei den SEC-Messungen des HSA-Standards (Abbildung 80, Anhang). Die zu erwartende Linearität bei den Messungen der Standards lässt sich gut zeigen und die Abweichungen sind relativ gering, was durch die guten Bestimmtheitsmaße (R^2) der Kalibrierkurven von 0,9987 bei der FIA und 0,9996 bei der SEC gezeigt wird. Verglichen mit der FIA konnten für die unterschiedlichen Proteine mit der SEC Wiederfindungsraten zwischen 26 und 40 % erreicht werden (Tabelle 15). Mit der FIA konnte eine Anti-IL-8 Konzentration von $3,21 \pm 0,08$ mg/mL und mit der SEC $3,18 \pm 0,06$ mg/mL bestimmt werden.

Um zu überprüfen, ob die erzielten Ergebnisse nur mit diesen Geräten erzielt werden können oder ob die verwendete Methode auch auf andere LC-MS Systeme übertragbar ist, wurde dies mit weiteren Messungen untersucht. Dazu wurden erneut FIA und SEC-Messungen durchgeführt und mit einem anderen ICP-MS (Element 2, Thermo Scientific, Bremen) gemessen. Die eingesetzte Säule hat mit einem Millimeter einen deutlich geringeren Durchmesser als die zuvor verwendete Säule, dies verringert erheblich die einzusetzende Proteinmenge. Als Standard wurde HSA verwendet. Der Vergleich der Kalibrierkurven zeigt eine stärkere Ähnlichkeiten der Steigungen der Element 2-Messungen als die der ELAN DRC II-Messungen (Abbildung 81, Anhang). Die Bestimmtheitsmaße sind mit 0,9949 (FIA) und 0,9942 (SEC) ebenfalls gut, wobei die Intensitäten um den Faktor acht bis zehn höher sind.

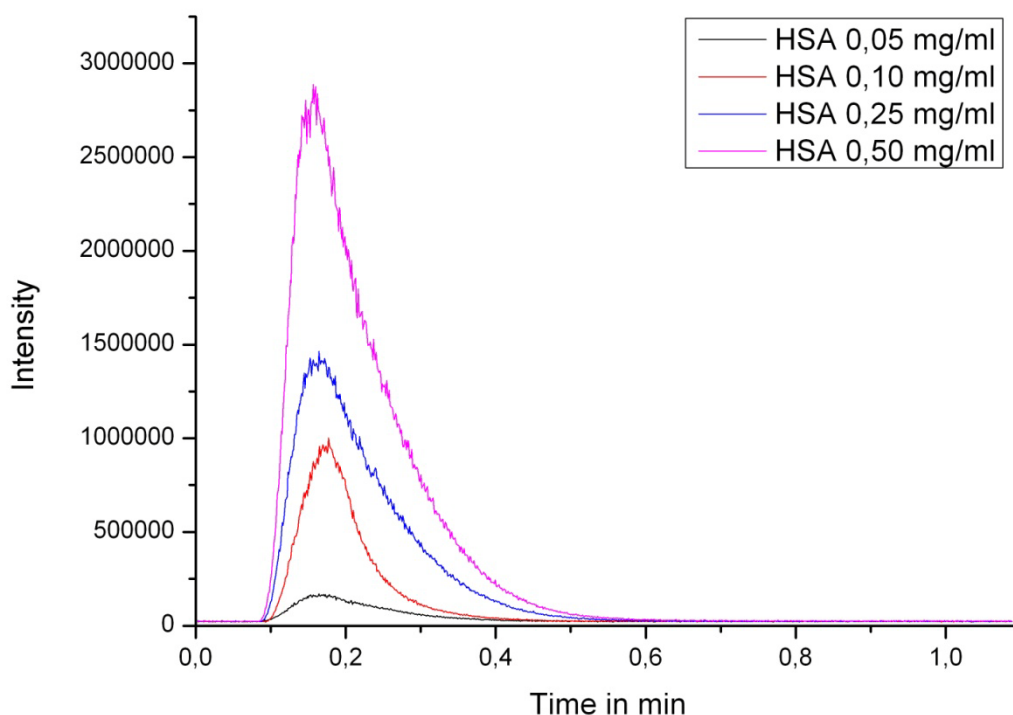


Abbildung 71: Vergleich der LC-ICP-MS Messungen ($m/z = 32$; ^{32}S) der FIA des HSA-Standards in unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Chromatogramme der LC/ICP-MS Messungen der FIA von HSA in unterschiedlichen Konzentrationen und des Antikörpers in unterschiedlichen Verdünnungen sind in Abbildung 71 und Abbildung 82 (Anhang) zu sehen. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Messungen ist in diesen Messungen ein sehr starkes Tailing der Peaks zu erkennen. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass bei vorhergehenden Messungen eine Flussrate von 300 $\mu\text{L}/\text{min}$ und später von 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ verwendet wurde. Als Antikörperkonzentration wurden $3,36 \pm 0,61 \text{ mg/mL}$ bestimmt. Aus den SEC-Messungen konnte die gleiche Antikörperkonzentration von $3,36 \pm 0,26 \text{ mg/mL}$ bestimmt werden, wobei die Wiederfindung zwischen 45 % für den Antikörper und 103 % für das HSA lag (Tabelle 15). Die relativ hohen Standardabweichungen in der Wiederfindung bei der Shodex SEC-Säule können dadurch erklärt werden, dass SEC-Säulen allgemein bei kleinen Innendurchmessern der Säulen schlechte Wiederfindungen aufweisen. Der Vergleich der unterschiedlichen ICP-MS-Messungen zeigt eine gute Übereinstimmung der berechneten Konzentrationen untereinander (Tabelle 16), diese liegen im Mittel bei 3,28 mg/mL .

Die Bradford Messungen wurden mit BSA als Standard durchgeführt und ergaben eine Antikörperkonzentration von $2,37 \pm 0,17 \text{ mg/mL}$.

Tabelle 15: Wiederfindungen der eingesetzten Proteine bei den SEC-ICP-MS Messungen.

	UHRSEC, 4,6 mm x 300 mm (Waters)	KW402.5-1E, 1 mm x 250 mm (Shodex)
Anti-Interleukin-8	40,47 ± 4,94 %	45,60 ± 29,52 %
HSA	35,86 ± 4,14 %	103,12 ± 15,85 %
Myoglobin	26,17 ± 2,92 %	

Tabelle 16: Vergleich der berechneten Konzentrationen des Anti-IL-8-Antikörpers.

Instrument	Experiment	Konzentration mg/mL
ELAN DRC II	FIA (Myoglobin)	3,21 ± 0,08 (N = 3)
	SEC (HSA)	3,18 ± 0,06 (N = 3)
Element2	FIA (HSA)	3,36 ± 0,61 (N = 3)
	SEC (HSA)	3,36 ± 0,26 (N = 3)
Spectra max PLUS 384	Bradford-Assay (BSA)	2,37 ± 0,17 (N = 5)

Die mittels ICP-MS bestimmten Werte liegen zwischen 20 und 30 % höher als die durch photometrische Methoden bestimmten. Die Bestimmung der Konzentration ist bei der Kenntnis des Schwefelgehaltes des Proteins bzw. Antikörpers durch die Messung der Schwefelkonzentration sehr spezifisch und kann durch eine geeignete Kalibrierung sehr genaue Ergebnisse liefern. In diesem Verfahren können strukturelle Unterschiede zwischen Standard und Analyt durch Kenntnis des Schwefelgehaltes ausgeglichen werden und haben somit keinen Einfluss auf die Bestimmung der Konzentration. Dieser Ausgleich ist jedoch für die Konzentrationsbestimmung mittels Bradford-Assay nicht möglich. Somit ist die Wahl eines geeigneten Standards sehr bedeutend, da die Unterschiede zwischen dem BSA-Standard und dem Analyt nicht ohne weiteres ausgeglichen werden können.

Abschließend lässt sich feststellen, dass eine Methode gefunden wurde, um Antikörper zu quantifizieren. Dieses Verfahren ist durch den Einsatz der ICP-MS und entsprechend gut charakterisierter Standards auch auf Primärstandards rückführbar, wobei strukturelle Unterschiede zwischen Standard und Analyt keine Rolle spielen. Darüber hinaus können auch Antikörper, bei denen die Aminosäuresequenz nicht bekannt ist, untersucht und quantifiziert werden, solange mindestens der Gehalt an einer schwefelhaltigen Aminosäure bekannt ist. Des Weiteren wurden die vermuteten Unterschiede zu den Ergebnissen des Bradford-Assays bestätigt, wobei diese etwa 30 % niedriger liegen als die mittels ICP-MS bestimmten. Eine

Möglichkeit, um die Bestimmung mittels photometrischer Methoden zu verbessern, wäre es, einen vollständig charakterisierten Antikörper als Standard einzusetzen, der dem zu messenden Antikörper in Größe und Struktur gleicht und dessen Konzentration mittels ICP-MS ermittelt wurde.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Abschließend kann gesagt werden, dass es gelungen ist, einen IgG1-Antikörper mittels massenspektrometrischer Methoden zu untersuchen. Es konnten für den betrachteten Anti-Interleukin-8-Antikörper und dessen Fragmente die molekularen Massen bestimmt werden. Die Bildung von Oligomeren wurde untersucht und neben der Messung verschiedener Oligomere, bis hin zum Pentamer, konnten auch Erkenntnisse gewonnen werden, dass Konzentrationseffekte maßgeblich zur Oligomerbildung bei diesem Antikörper beitragen. Aus der Literatur sind verschiedenste Modifikationen von Antikörpern bekannt. Diese, insbesondere verschiedene Glykosylierungen, wurden auch beim Anti-IL-8-Antikörper gefunden und konnten ebenso im F_C -Fragment detektiert werden. Weiterhin konnten diese Modifikationen auch im ESI-MS-Spektrum des Dimers gemessen werden. Neben diesen natürlichen Modifikationen wurden auch Derivatisierungen des Antikörpers analysiert. Dabei konnten verschiedene Markierungsgrade bestimmt werden, auch wenn diese nebeneinander als Mischung vorlagen. Auch konnte teilweise festgestellt werden, an welchen Fragmenten sich diese Markierungen befinden. Der Nachweis, dass der Antikörper auch weiterhin intakt und bindungsfähig ist, konnte erbracht werden. Die Bildung von Komplexen des Antikörpers mit verschiedenen Proteinen konnte ebenfalls gezeigt werden. Als Ausblick könnte die Untersuchung der unterschiedlichen Zucker mit Hilfe von LC-MS oder Ionenmobilität Aufschluss über die Unterschiede in der Glykosylierung liefern. Auch könnten diese Analysen eventuell Ansätze liefern, um die noch vorhandenen, nicht identifizierten Modifikationen aufzuklären.

Die angestrebte Untersuchung der Wechselwirkungen des Antikörpers mit den unterschiedlichen Polymeren konnte, trotz des Einsatzes verschiedenster Methoden, nicht zufriedenstellend durchgeführt werden. Allerdings ergeben sich aus den zuvor durchgeführten Analysen Ansätze für zukünftige mögliche weitere Untersuchungen. Durch den Einsatz von markierten Antikörpern sollte es möglich sein, mittels ICP-MS bzw. LA-ICP-MS nachzuweisen, inwieweit der Antikörper überhaupt an den Polymeren gebunden hat. Dies sollte auch dann möglich sein, wenn der Antikörper nur an den Polymeren adsorbiert sein sollte. Die Iodierung des Antikörpers könnte ebenfalls in dieser Hinsicht Ergebnisse erbringen und somit auch für vorher nicht markierte Antikörper nutzbar sein.

Im letzten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es möglich war, eine Quantifizierungsstrategie für Antikörper zu entwickeln. Mit dieser können absolute

Quantifizierungen durchgeführt werden, während diese gleichzeitig unabhängig von Art und Struktur des einzusetzenden Standards sind. Damit ist es möglich, die Probleme des Bradford-Assays zu umgehen. Des Weiteren sind nur minimale Kenntnisse über den zu analysierenden Antikörper notwendig, sodass dieses Verfahren auch hervorragend auf bisher nicht charakterisierte Antikörper angewendet werden kann. Zur Absicherung der gewonnenen Ergebnisse wäre es notwendig, die Aminosäuresequenz des Antikörpers aufzuklären, da somit die Anzahl der Schwefelatome noch genauer bestimmt werden könnte. Mit einem dann sehr genau spezifizierten Antikörper wäre es möglich, diesen als Standard für Bradford-Assays zur Antikörperquantifizierung einzusetzen, solange die Unterschiede zwischen Analyt und Standard nicht zu groß wären. Die strukturellen Abweichungen zwischen den Mitgliedern eines Subtyps derselben Spezies sollten sehr gering sein.

7. Anhang

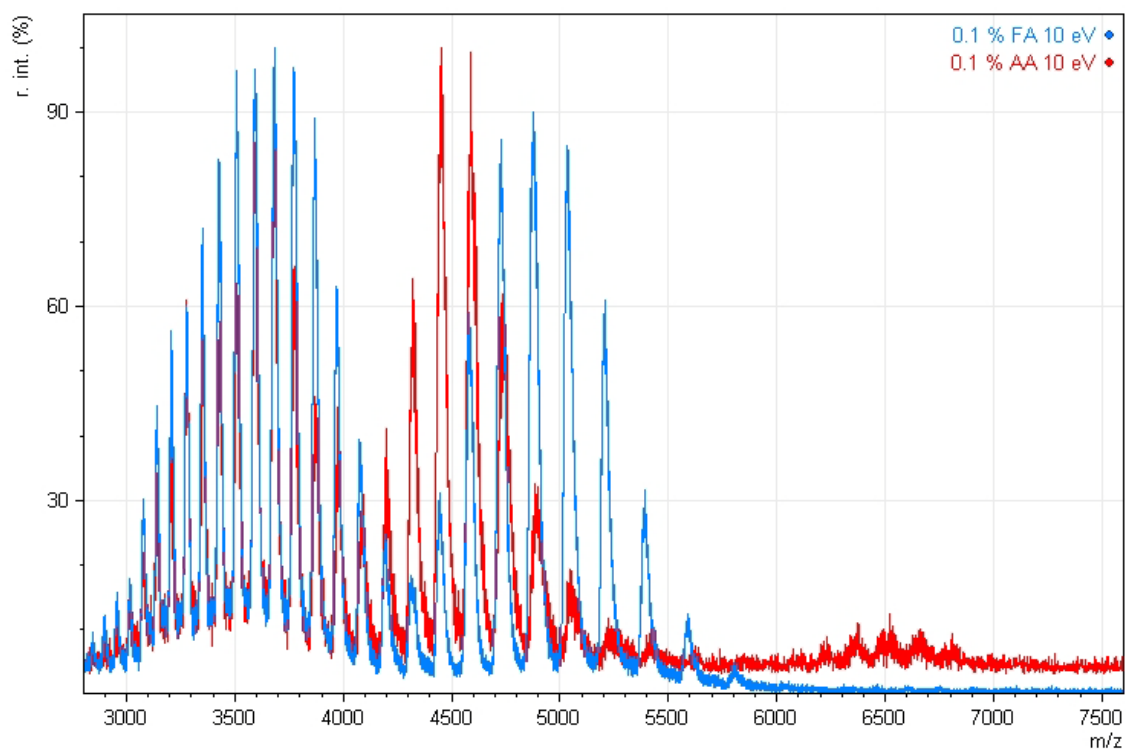


Abbildung 72: Vergleich von ESI-MS Spektren von Anti-Interleukin-8 in Essigsäure (AA, rot) und Ameisensäure (FA, blau).

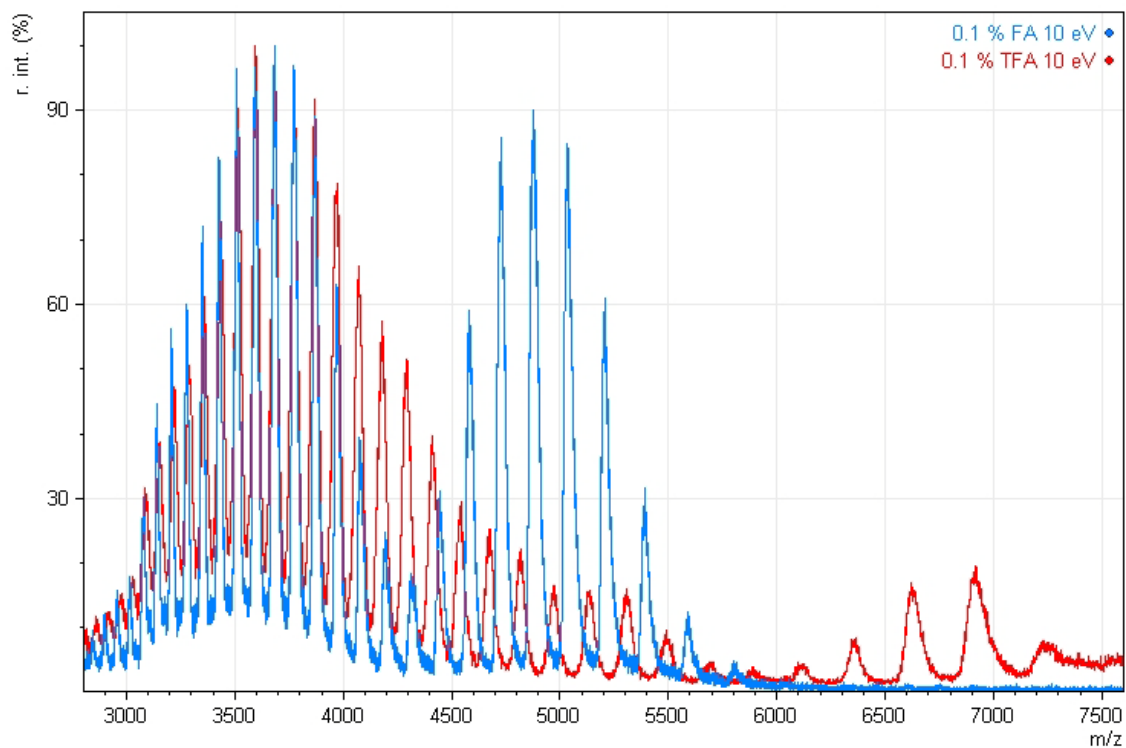


Abbildung 73: Vergleich von ESI-MS Spektren von Anti-Interleukin-8 in Trifluoressigsäure (TFA, rot) und Ameisensäure (FA, blau).

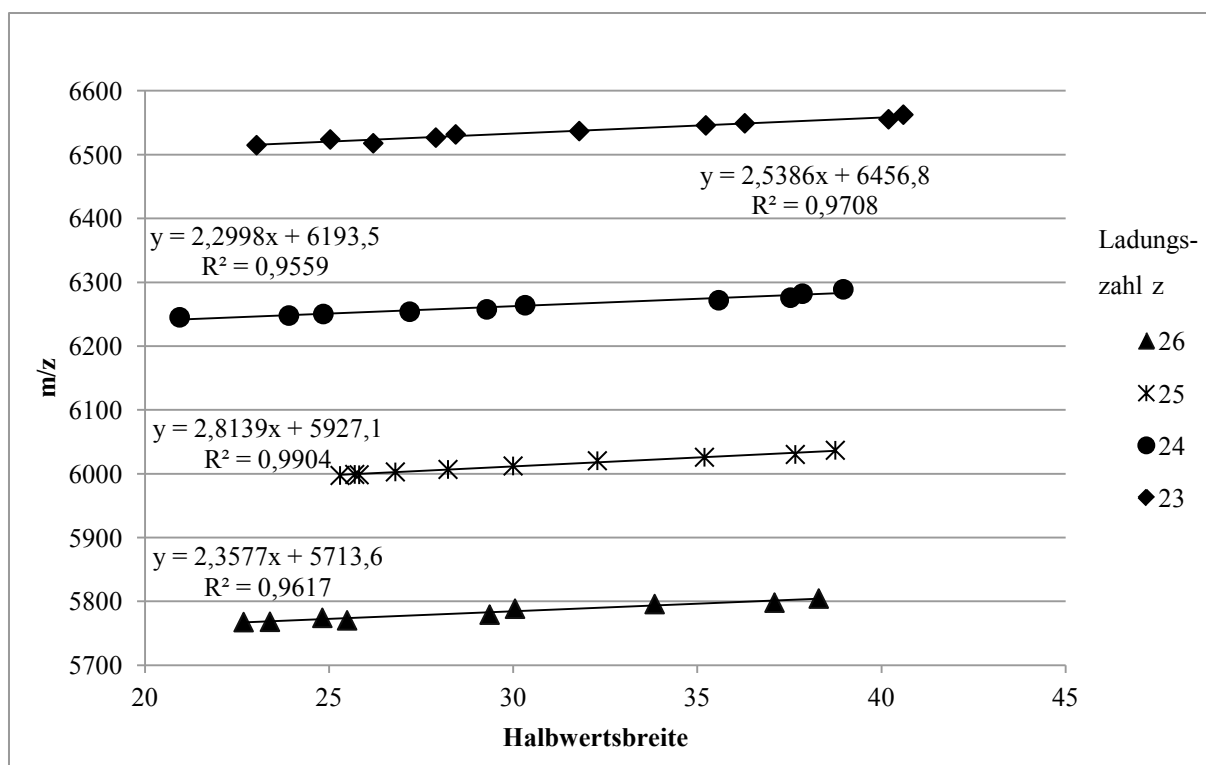


Abbildung 74: m/z -Werte der Signale in Abhängigkeit der Halbwertsbreiten für verschiedene Kollisionsenergien zur Bestimmung der Molekülmassen des Anti-IL-8-Antikörpers.

Tabelle 17: Errechnete Masse des Anti-IL-8-Antikörpers unter Einbeziehung der Halbwertsbreiten.

Ladung	Masse in Da	R ²
22	149.391	0,8248
23	148.092	0,9708
24	148.212	0,9559
25	147.728	0,9904
26	148.086	0,9617
Mittelwert	148.302 ± 635 (n = 5)	

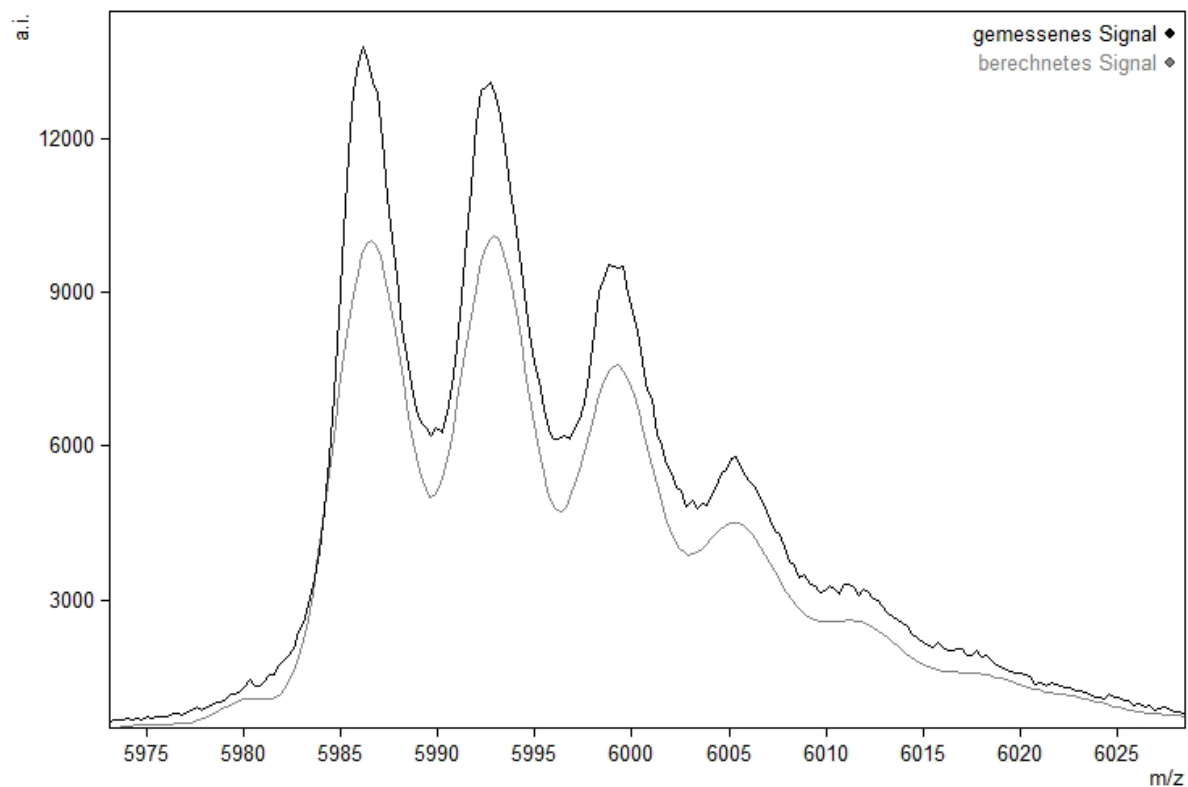


Abbildung 75: Vergleich des gemessenen ESI-MS-Spektrums des Anti-IL-8-Antikörpers (schwarz) und des mittels MaxEnt modellierten Spektrums (grau).

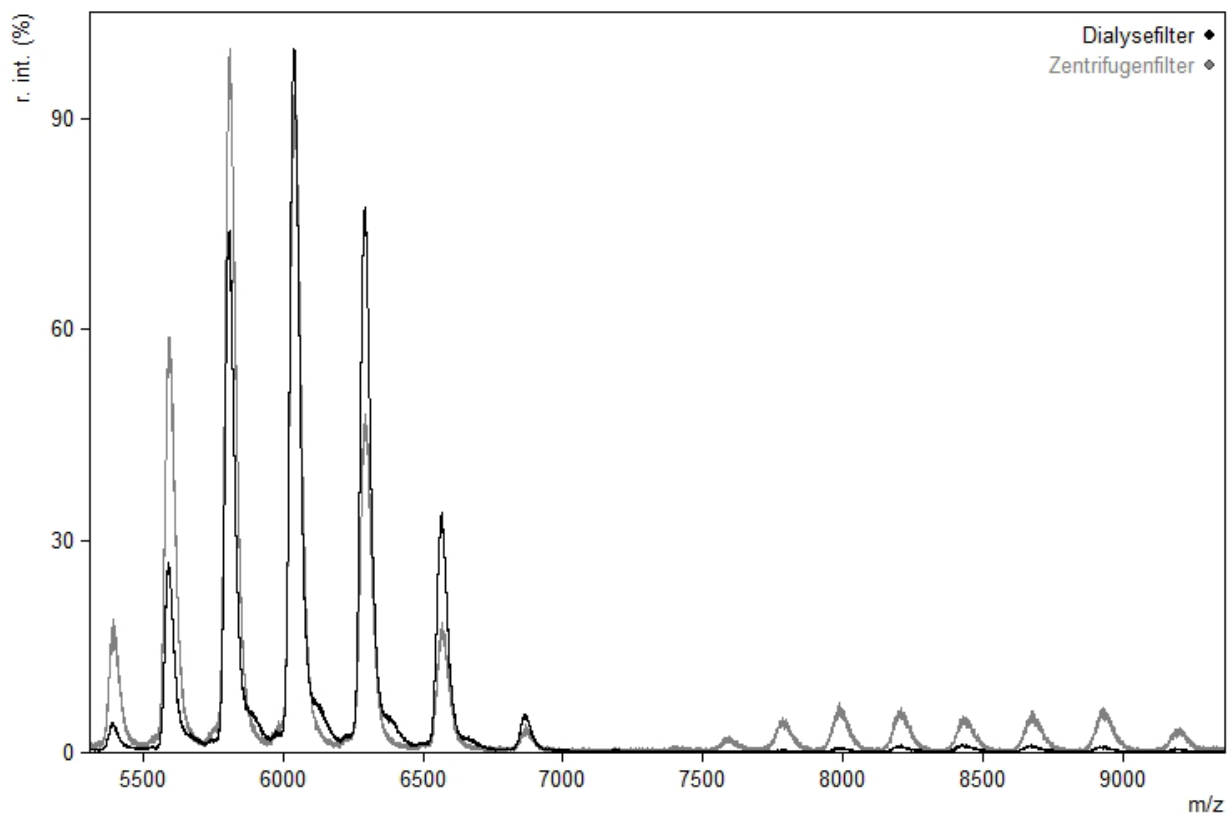


Abbildung 76: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers, Umpufferung mittels Zentrifugenfilters (schwarz) und Dialyse (grau), 10 eV Kollisionsenergie in 200 mM Ammoniumacetat.

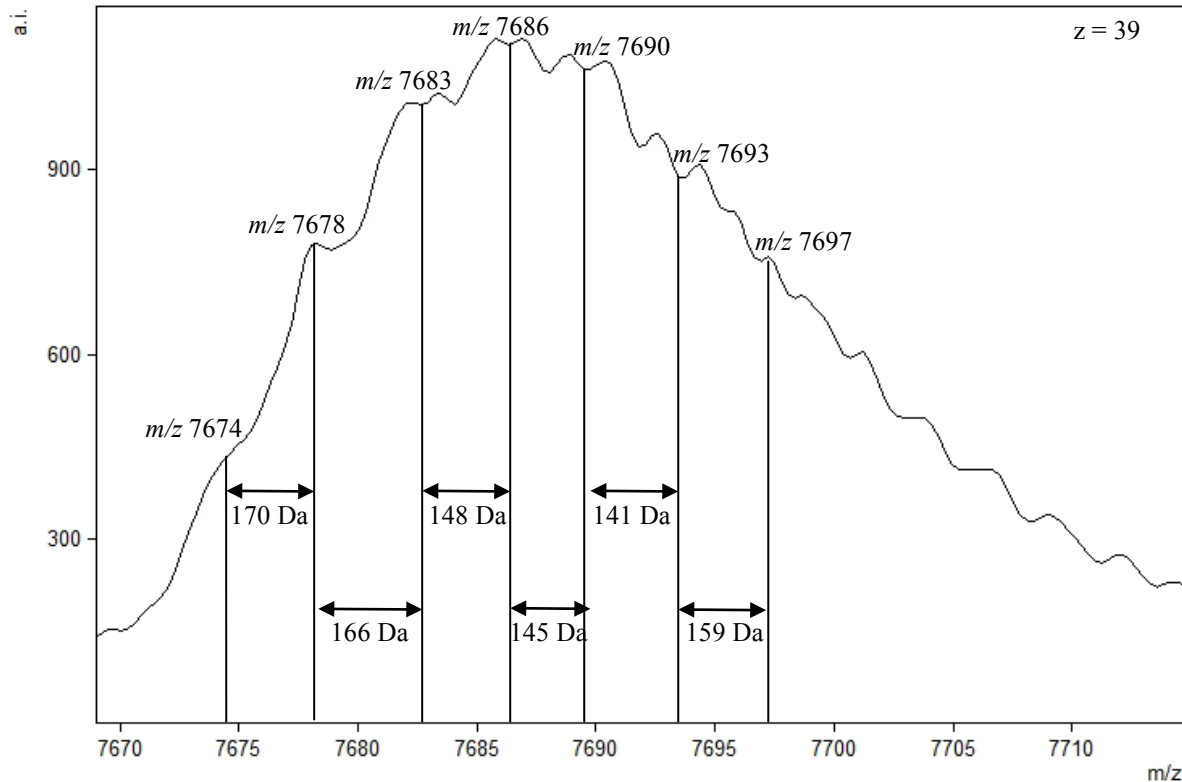


Abbildung 77: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörperdimers. Die Unterschiede zwischen den Signalen können durch unterschiedliche Modifizierungen erklärt werden.

Tabelle 18: Errechnete Masse des deglykosylierten Anti-IL-8-Antikörpers bei verschiedenen Kollisionsenergien.

Kollisionsenergie in eV	Masse in Da	Standardabweichung in Da (n = 7)
10	149.986	509
20	148.853	161
30	147.910	101
40	147.378	123
50	147.049	148
60	146.835	132
70	146.717	117
80	146.608	125
90	146.533	88
100	146.467	69
110	146.410	92

Tabelle 19: Errechnete Massen des intakten Anti-IL-8-Antikörpers und dessen Fragmenten, sowie des deglykosylierten Antikörpers.

	Massen in Da
Anti-IL-8-Antikörper	149.471 ± 51 (n = 6)
F _{(ab)2} -Fragment des Anti-IL-8-Antikörpers	98.996 ± 5 (n = 4)
F _c -Fragment des Anti-IL-8-Antikörpers	50.922 ± 3 (n = 2)
F _{ab} -Fragment des Anti-IL-8-Antikörpers	48.016 ± 6 (n = 5)
deglykosylierter Anti-IL-8-Antikörper	146.410 ± 92 (n = 7)

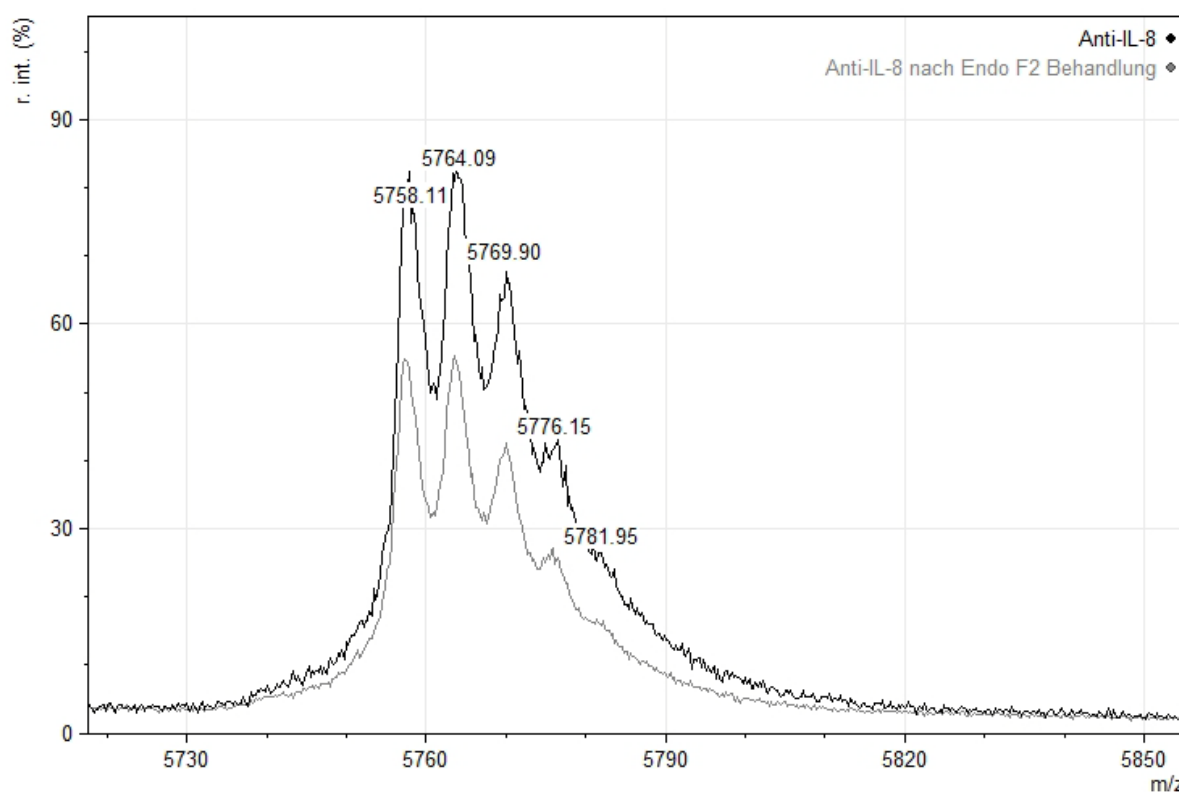


Abbildung 78: Vergleich der ESI-MS-Spektren des reinen Anti-Interleukin-8-Antikörpers (schwarz) und des mit Endo-F2 proteolysierten (grau) bei einer Kollisionsenergie von 100 eV.

Tabelle 20: Überblick der Markierungsgrade der untersuchten Antikörper.

Serie	Anti-Interleukin-8-Antikörper				MUC-1-Antikörper	
	40-facher Überschuss		100-facher Überschuss		40-facher Überschuss	
	Masse in Da	Markierungsgrad	Masse in Da	Markierungsgrad	Masse in Da	Markierungsgrad
A	149.218,6	0,00	149.227,9	0,00	147.782,3	0,00
B	149.934,6	1,00	149.941,5	1,00	148.508,1	0,94
C	150.661,1	2,02	150.634,9	1,98	149.172,7	1,96
D			151.341,5	2,97		
E			152.053,9	3,95		

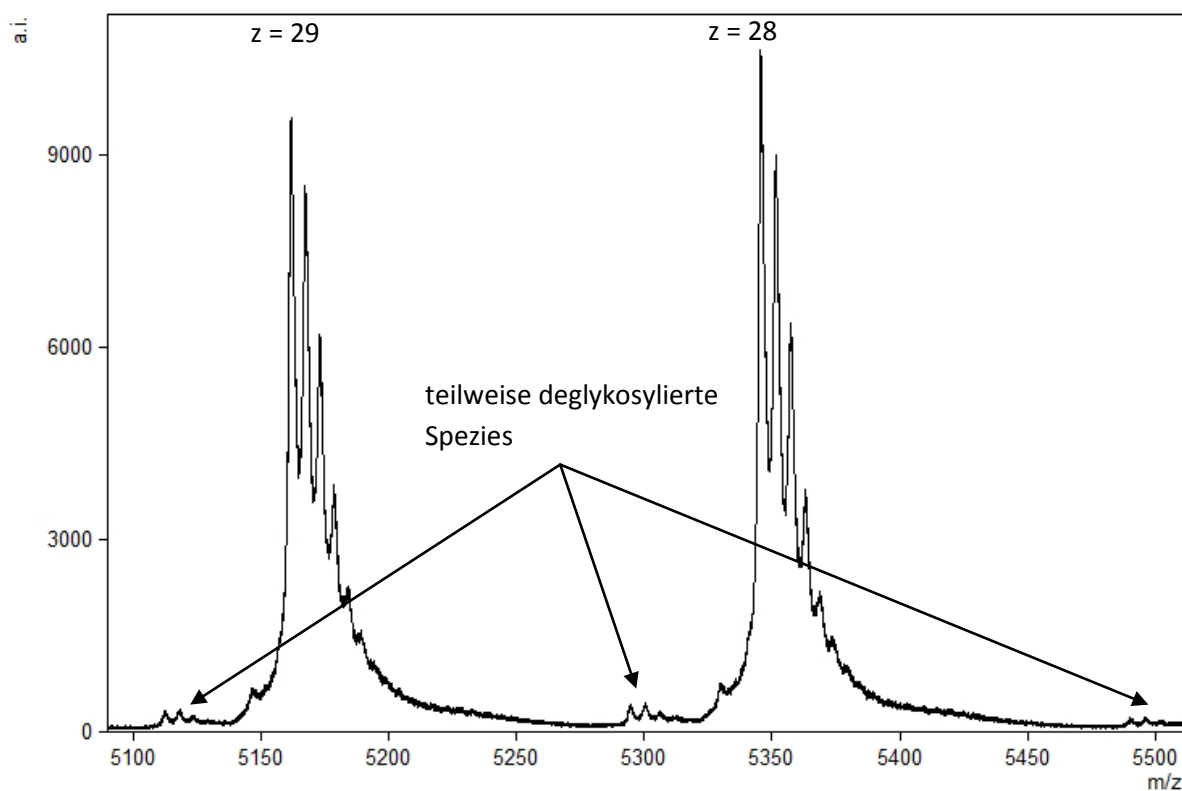


Abbildung 79: ESI-MS-Spektrum Anti-L-8-Antikörpers mit der teilweise deglykosylierten Spezies neben dem kompletten Antikörper, Kollisionsenergie 10 eV, neue Charge.

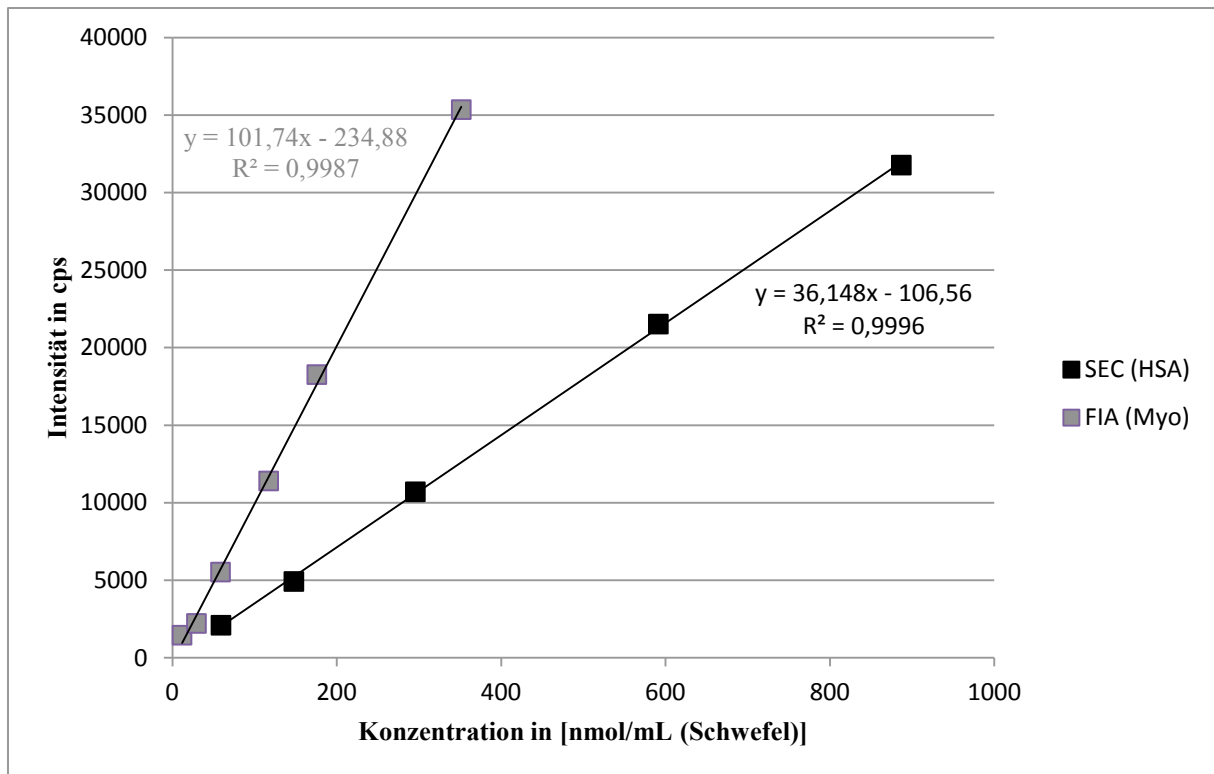


Abbildung 80: Kalibrierkurven der Schwefelmessungen ($m/z = 48$; $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$) des HSA-Standards mittels SEC und des Myoglobinstandards mittels FIA (ELAN DRC II).

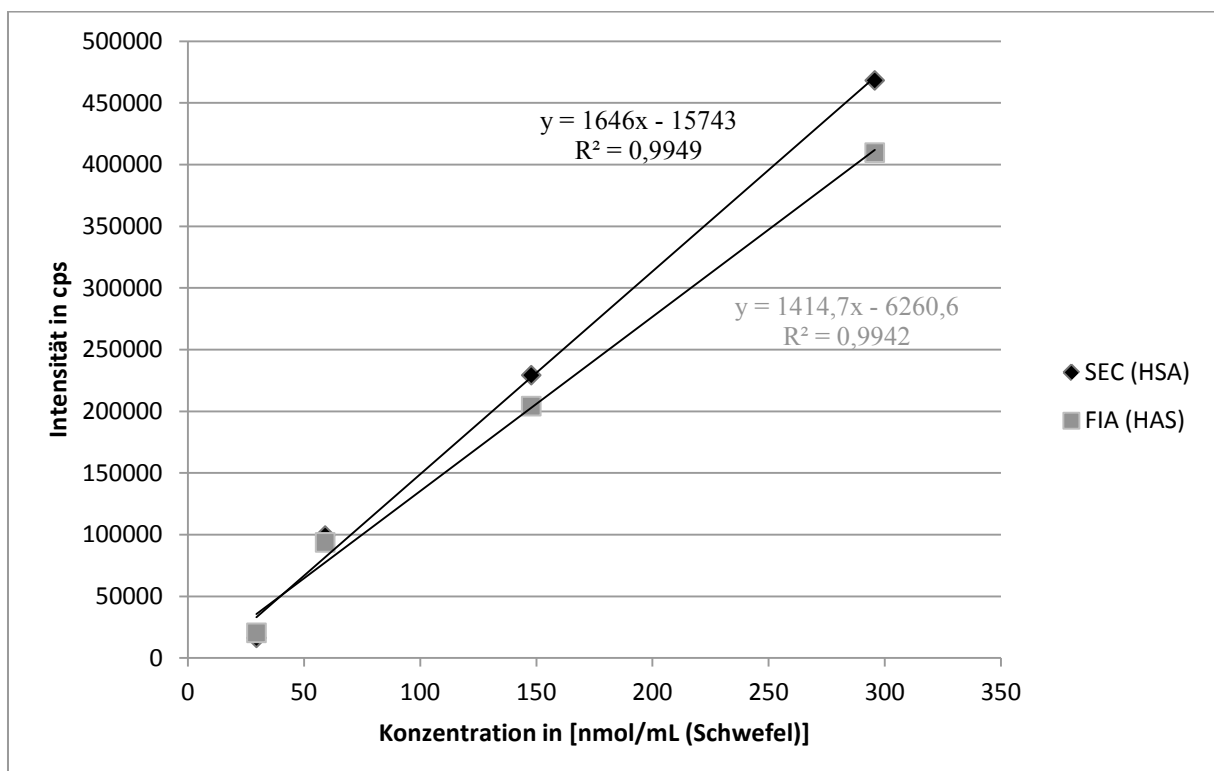


Abbildung 81: Kalibrierkurven der Schwefelmessungen ($m/z = 32$; ^{32}S) des HSA-Standards mittels SEC und FIA (Element 2).

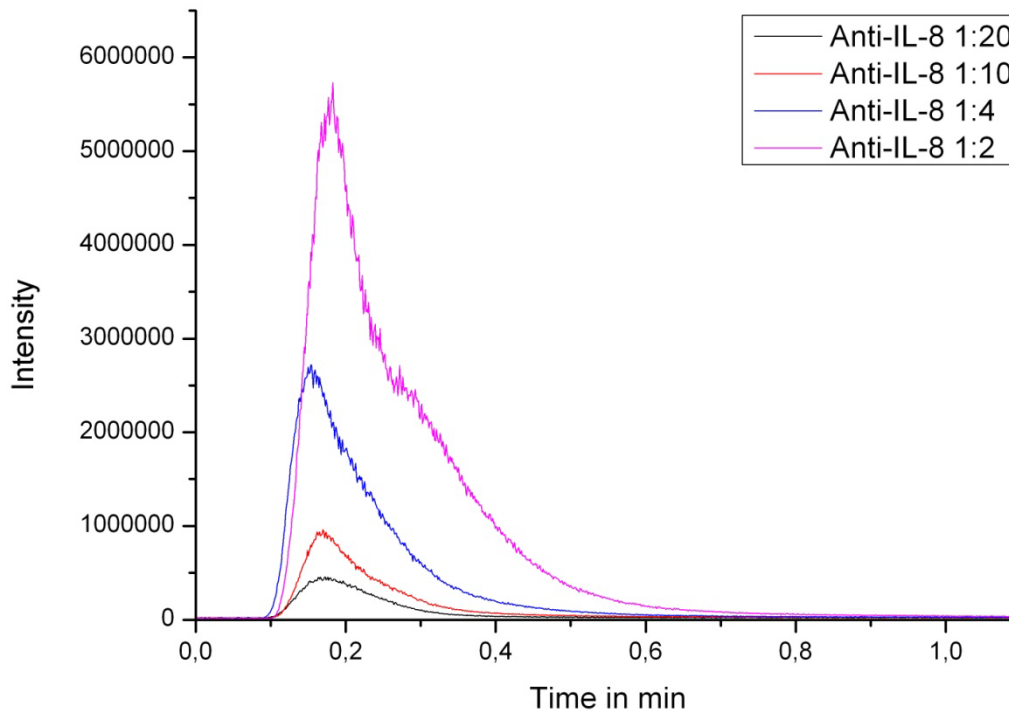


Abbildung 82: Vergleich der LC/ICP-MS Messungen ($m/z = 32$; ^{32}S) der Fließinjektionen des Anti-IL-8-Antikörpers in unterschiedlichen Verdünnungen (Element 2).

Schwefelkonzentrationsberechnung

In den Gleichungen 1 und 2 ist die Berechnung der Schwefelkonzentration dargestellt, wobei die Konzentration c in nmol/mL angegeben ist, p ist die Massenkonzentration in mg/mL und z entspricht der Anzahl an Schwefelatomen im Molekül. Um aus den Messwerten des Antikörpers Konzentrationen errechnen zu können, muss die aus den Daten der Kalibrierkurve entsprechende Gleichung 2 ermittelt werden.

$$c = p * M * z(S) * 10^9$$

Gl. 1: Berechnung der Schwefelkonzentration der Standards.

$$x = \frac{(y + n)}{m} \quad c = \frac{x}{z(S)} \quad p = \frac{(c * M)}{10^6}$$

Gl. 2: Berechnung der Antikörperkonzentration.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Allgemeine Struktur eines Antikörpers nach ^[14]	6
Abbildung 2: Strukturen der unterschiedlichen Immunglobuline, mit den Unterschieden in den Glykosylierungen (Kreise) mit deren jeweiligen Positionen, an welchen sich diese Aminosäuren befinden ^[14]	7
Abbildung 3: Strukturen der unterschiedlichen IgG Subklassen mit Darstellung der unterschiedlichen Anzahl an Disulfidbrücken ^[25]	8
Abbildung 4: Struktur eines IgG 1-Antikörpers mit den unterschiedlich möglichen Glykosylierungsmustern nach ^[36]	9
Abbildung 5: Struktur eines IgG 1 mit den Bindungsstellen von Protein A (SpA), Protein G (SpG) und Protein L (PpL) ^[40]	10
Abbildung 6: Struktur von p-SCN-Bn-DOTA, wobei das zentrale Metallion ein dreifach positives Lanthanoid ist.	12
Abbildung 7: Schematische Darstellung aller möglichen Reduktionsprodukte eines IgG Antikörpers, die durch die Reduktion der intra- und intermolekularen Disulfidbrücken entstehen können. Durch partielle Reduktion können ausgehend vom kompletten Antikörper (A) über die Zwischenstufen (B-D) die einzelnen Ketten (E, F) erhalten werden ^[112]	16
Abbildung 8: Proteolysen eines IgG mit Papain bzw. Pepsin, abgeändert nach ^[118]	17
Abbildung 9: Iodierung von Tyrosin und Histidin mittels KI ₃	18
Abbildung 10: Strukturen der Monomere des Polymers 6.	23
Abbildung 11: Struktur des KYTR-Monomers.	23
Abbildung 12: Struktur des Polymers 10.1.	24
Abbildung 13: Bindung von aktiven Gruppen an die Membranoberfläche ^[165]	25
Abbildung 14: Schematische Darstellung der Herstellung von molekular geprägten Polymeren.	26
Abbildung 15: Schematische Darstellung des High-mass Q-ToF-MS Gerätes von MS Vision (Niederlande) ^[108]	31
Abbildung 16: Schematische Darstellung der Feld-Fluss-Fraktionierung [Grafik von Postnova Analytics GmbH, Landsberg am Lech, Deutschland]	32
Abbildung 17: Silbergefärbte zweidimensionale Gelelektrophorese des Anti-IL-8-Antikörpers, (a) vor und (b) nach der Aufreinigung mit einer Protein-A-Säule. Die Trennung in leichte und schwere Kette erfolgte aufgrund der reduzierenden Trennbedingungen. Die Proteinverunreinigungen aus dem Nährmedium (fetale Kälberserum) konnten durch die Aufreinigung effektiv entfernt werden.	51
Abbildung 18: Vergleich der MALDI-MS-Messungen des Anti-IL-8-Antikörpers in unterschiedlichen Matrices.	53
Abbildung 19: MALDI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers und eines humanen IgG, jeweils in einer DHB-Matrix.	53
Abbildung 20: Einfluss der Quelltemperatur auf das ESI-MS Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat im Bereich von 22 °C bis 80 °C. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einer effizienteren Desolvatisierung der Analytionen. Die m/z-Werte beziehen sich auf das Spektrum bei 78-80 °C, die Ladungszahlen auf alle, jeweils übereinander liegenden Signale.	55
Abbildung 21: Intensität des Totalionenstromes während laufender ESI-MS Messungen des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat, bei gleichzeitiger Erhöhung der Quelltemperatur von 22 °C auf 80 °C.	55
Abbildung 22: Intensität des Totalionenstromes während laufender ESI-MS Messungen des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat, bei gleichzeitiger Erhöhung des Quellendrucks von 2,2 auf 100 mbar.	56
Abbildung 23: Einfluss der Änderung der Cone- und Extraktorspannungen auf das ESI-MS Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetatpuffer.	57
Abbildung 24: ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers bei unterschiedlichen Kollisionsenergien (blau 10 eV, grün 50 eV und gelb 100 eV).	58

Abbildung 25: Vergleich von ESI-MS-Spektren von Anti-IL-8 in AA (grün), TFA (rot) und FA (blau). Es zeigen sich bei Verwendung der organischen Säuren hohe Ladungszustände und intensive Signale mit geringer Halbwertsbreite.	60
Abbildung 26: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-Interleukin-8 Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat (grün), 200 mM Triethylammoniumacetat (gelb) und 200 mM Ammoniumformiat (blau).	61
Abbildung 27: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers in den vier verschiedenen Puffern (grün: Ammoniumacetat; gelb: Triethylammoniumacetat; blau: TFA und rot: FA). Mit organischen Säuren in der Messlösung können höhere Ladungszustände erreicht werden, wobei die Signale dann schlechter unterschieden werden können.	61
Abbildung 28: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8 Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat bei verschiedenen pH-Werten. Zur Messung wurde der pH-Wert schrittweise von 7,0 (blau), pH 4,0 (grün) und pH 3,5 (rot) verändert.	63
Abbildung 29: ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8 Antikörpers in 200 mM Ammoniumacetat (grün, pH 4) und zum Vergleich in Essigsäure. Zur Messung wurde der pH-Wert der AA-Lösungen von 3,2 (blau) auf 4 (rot) erhöht.	63
Abbildung 30: Dekonvoliertes Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers.	66
Abbildung 31: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8 in 200 mM Ammoniumacetat (schwarz) und 200 mM Triethylammoniumacetat (grau) bei erniedrigter Kollisionsenergie von jeweils 0,5 eV.	67
Abbildung 32: ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers in 0,1 % TFA (grau) und 0,1 % FA (schwarz) bei einer Kollisionsenergie von 0,5 eV. Bei den hohen Ladungszuständen bleiben keine Oligomere erhalten.	68
Abbildung 33: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers in 200 mM Triethylammoniumacetat, Verringerung der Kollisionsenergie von 3 auf 2,5 eV. Neben den bereits gezeigten Mono-, Di- und Trimeren konnten auch das Tetra- und Pentamer detektiert werden.	68
Abbildung 34: Fraktogramm des Anti-Interleukin-8-Antikörpers, zeitaufgelöste Messung des Brechungsindex (grau) und der Lichtstreuung (schwarz).	69
Abbildung 35: Vergleich der Fraktogramme des Anti-Interleukin-8-Antikörpers und von BSA, gezeigt ist jeweils die Partikelgröße.	70
Abbildung 36: DLS-Messung des Anti-IL-8-Antikörpers, volumengewichtet.	71
Abbildung 37: Vergleich der ESI-MS Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers, Umpufferung mittels Zentrifugensfilters (grau) und Dialyse (schwarz), 1 eV Kollisionsenergie in 200 mM Ammoniumacetat.	72
Abbildung 38: ESI-MS-Spektrum des mittels TCEP bei 50 °C reduzierten Anti-IL-8-Antikörpers. Den Signalen sind die Reduktionsprodukte entsprechend Abbildung 7 zugeordnet.	74
Abbildung 39: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers nach der Proteolyse mit Pepsin nach einer (grau) und vier (schwarz) Stunden. Nach vier Stunden ist der vollständige Antikörper in einzelne Fragmente gespalten worden. Mit längerer Inkubationszeit wird auch das F _c -Fragment proteolysiert.	75
Abbildung 40: MALDI-MS-Spektren der ungereinigten Papainproteolyse des Anti-IL-8-Antikörpers (grau) und nach (schwarz) der Aufreinigung mittels Protein A. Während in der ungereinigten Papainproteolyse Papain und das F _c - und das F _{ab} -Fragment vorhanden sind, ist es in der gereinigten nur das F _c -Fragment.	77
Abbildung 41: ESI-MS-Spektren der ungereinigten Papainproteolyse des Anti-IL-8-Antikörpers (schwarz) und nach (grau) der Aufreinigung mittels Protein A bei 10 eV Kollisionsenergie. In der nicht aufgereinigten Lösung ist das F _{ab} - und das F _c -Fragment vorhanden, in der gereinigten nur das F _c -Fragment.	77
Abbildung 42: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers. Die Unterschiede zwischen den Signalen können durch unterschiedliche Glykosylierungen erklärt werden.	79
Abbildung 43: ESI-MS-Spektrum des F _c -Fragments des Anti-IL-8-Antikörpers bei einer Kollisionsenergie von 100 eV.	79
Abbildung 44: Vergleich von ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers vor Form (grau) und nach der Deglykosylierung mittels PNGase F (schwarz) bei einer Kollisionsenergie von jeweils 100 eV, die Ladung der einzelnen Signale beträgt 25. Der Unterschied beträgt 2844 Da, was der Deglykosylierung entspricht. Die verbleibende Signalaufspaltung deutet auf weitere Modifikationen hin.	81
Abbildung 45: ESI-MS-Spektrum des F _{(ab)2} -Fragments des Anti-IL-8-Antikörpers bei einer Kollisionsenergie von 100 eV.	81
Abbildung 46: Vergleich der ESI-MS-Spektren des nicht markierten (grau) und des p-SCN-BN-DOTA(Ho) markierten Anti-IL-8 Antikörpers (schwarz), die Kollisionsenergie betrug 140 eV. Die Markierung wurde mit	

einem Verhältnis von Markierungsreagenz zu Antikörper von 40 zu 1 durchgeführt. Dieser Überschuss führt zur ein- und zweifach Markierung des Antikörpers, der daneben auch noch unmarkiert vorliegt.	84
Abbildung 47: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers bei einer Kollisionsenergie von 140 eV. Die Markierung wurde mit einem Verhältnis von Markierungsreagenz zu Antikörper von 100 zu 1 durchgeführt. Überschuss führt zur ein-, zwei-, drei- und vierfachen Markierung des Antikörpers, der daneben auch noch unmarkiert vorliegt.	85
Abbildung 48: ESI-MS-Spektrum des MUC-1-Antikörpers bei einer Kollisionsenergie von 140 eV. Die Markierung wurde mit einem Verhältnis von Markierungsreagenz zu Antikörper von 40 zu 1 durchgeführt. Dieser Überschuss führt zur ein- und zweifachen Markierung des Antikörpers, der daneben auch noch unmarkiert vorliegt.	85
Abbildung 49: LA-ICP-MS-Messung von ^{165}Ho des mit <i>p</i> -SCN-Bn-DOTA(Ho) markierten Anti-IL-8-Antikörpers auf einer Dot-Western-Blotoberfläche im Komplex mit dem immobilisierten Antigen in unterschiedlichen Verdünnungen.	86
Abbildung 50: Intensität des ^{165}Ho Signals in Abhängigkeit der Konzentration des <i>p</i> -SCN-Bn-DOTA(Ho) markierten Anti-IL-8-Antikörpers, gemessen mittels LA-ICP-MS.	87
Abbildung 51: Intensitätsprofil eines LA-ICP-MS-Linienscan von <i>p</i> -SCN-Bn-DOTA(Ho) markiertem Anti-IL-8-Antikörper, bei einer Verdünnung von 1:2000, auf einer Dot-Westernblotoberfläche mit der Negativkontrolle durch BSA.	88
Abbildung 52: ESI-MS-Spektrum des mit Pr-MeCAT-Mal markierten Anti-IL-8-Antikörpers. Die leichte Kette ist einfach und die schwere Kette dreifach markiert. Der halbierte Antikörper liegt in zwei Varianten vor, wobei die Variante A vierfach und die Variante B zweifach markiert ist.	89
Abbildung 53: ESI-MS-Spektrum des mittels TCEP reduzierten Anti-IL-8-Antikörpers. Zwei Varianten des halbierten Antikörpers können neben dem kompletten Antikörper detektiert werden.	90
Abbildung 54: ESI-MS-Spektren des reduzierten und mit Iodacteamid alkylierten Anti-IL-8-Antikörpers. Es sind beispielhaft die Signale der leichten Kette und des halbierten Antikörpers des MeCAT-Mal markierten Antikörpers (schwarz) und des alkylierten Antikörpers (grau) gezeigt.	92
Abbildung 55: Vergleich der ESI-MS-Spektren des nicht iodierten (schwarz) und des mittels Iod-Kaliumiodid iodierten Protein A (grau) in 0,1 % FA gemessen, bei einer Kollisionsenergie von 10 eV.	96
Abbildung 56: ESI-MS-Spektrum des mittels Iod-Kaliumiodid iodierten Anti-IL-8-Antikörpers in 0,1 % FA gemessen, bei einer Kollisionsenergie von 15 eV.	97
Abbildung 57: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers/IL-8-Komplexes in 200 mM Ammoniumacetat, Kollisionsenergie 50 eV.	99
Abbildung 58: Kombiniertes MALDI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörpers/IL-8-Komplexes in DHB Matrix, unterer Massenbereich (grau) und oberer Massenbereich (schwarz).	100
Abbildung 59: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8/Protein A-Komplexes in 200 mM Triethylammoniumacetat.	100
Abbildung 60: Fraktogramm des Polymers 10, zeitaufgelöste Messung des Brechungsindex (Partikelgröße; grau) und der Lichtstreuung (Konzentration; schwarz).	103
Abbildung 61: DLS-Messung des Polymer 10, anzahlgewichtete Darstellung, zweifach Messung.	104
Abbildung 62: DLS-Messung des Polymer 10, intensitätsgewichtete Darstellung, zweifach Messung.	104
Abbildung 63: Fraktogramm des Polymers 10.1, zeitaufgelöste Messung des Brechungsindex (grau) und der Lichtstreuung (schwarz).	105
Abbildung 64: DLS-Messung des Polymers 10.1, intensitätsgewichtete Darstellung.	106
Abbildung 65: DLS-Messung des Polymers 10.1, volumengewichtete Darstellung.	106
Abbildung 66: Vergleich der Fraktogramme des Polymers 10.1 (hellgrau), Antikörpers (dunkelgrau) und der Mischung (schwarz).	107
Abbildung 67: DLS-Messung des Polymer-Antikörper-Gemisches, intensitätsgewichtete Darstellung.	108
Abbildung 68: Oxidierte Formen der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein.	110
Abbildung 69: Vergleich der LC-ICP-MS-Chromatogramme des hydrolysierten Lysozymstandards (schwarz) und des hydrolysierten Anti-Interleukin-8-Antikörpers (grau).	110
Abbildung 70: Intensitätsprofil der ICP-MS Messung ($m/z = 48$; $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$) der FIA von Myoglobin in unterschiedlichen Konzentrationen. Es handelt sich um jeweils drei Injektionen des jeweiligen Standards und zwei sich anschließende Blankinjektionen, wobei die Konzentrationen 0,1, 0,25, 0,5, 1, 1,5 und 3 mg/mL betragen. (ELAN DRC II).	111

Abbildung 71: Vergleich der LC-ICP-MS Messungen ($m/z = 32$, ^{32}S) der FIA des HSA-Standards in unterschiedlichen Konzentrationen.	113
Abbildung 72: Vergleich von ESI-MS Spektren von Anti-Interleukin-8 in Essigsäure (AA, rot) und Ameisensäure (FA, blau).	118
Abbildung 73: Vergleich von ESI-MS Spektren von Anti-Interleukin-8 in Trifluoressigsäure (TFA, rot) und Ameisensäure (FA, blau).	118
Abbildung 74: m/z -Werte der Signale in Abhängigkeit der Halbwertsbreiten für verschiedene Kollisionsenergien zur Bestimmung der Molekülmassen des Anti-IL-8-Antikörpers.	119
Abbildung 75: Vergleich des gemessenen ESI-MS-Spektrums des Anti-IL-8-Antikörpers (schwarz) und des mittels MaxEnt modellierten Spektrums (grau).	120
Abbildung 76: Vergleich der ESI-MS-Spektren des Anti-IL-8-Antikörpers, Umpufferung mittels Zentrifugentilters (schwarz) und Dialyse (grau), 10 eV Kollisionsenergie in 200 mM Ammoniumacetat.	120
Abbildung 77: ESI-MS-Spektrum des Anti-IL-8-Antikörperdimers. Die Unterschiede zwischen den Signalen können durch unterschiedliche Modifizierungen erklärt werden.	121
Abbildung 78: Vergleich der ESI-MS-Spektren des reinen Anti-Interleukin-8-Antikörpers (schwarz) und des mit Endo-F2 proteolysierten (grau) bei einer Kollisionsenergie von 100 eV.	122
Abbildung 79: ESI-MS-Spektrum Anti-IL-8-Antikörpers mit der teilweise deglykosylierten Spezies neben dem kompletten Antikörper, Kollisionsenergie 10 eV, neue Charge.	123
Abbildung 80: Kalibrierkurven der Schwefelmessungen ($m/z = 48$; $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$) des HSA-Standards mittels SEC und des Myoglobinstandards mittels FIA (ELAN DRC II).	124
Abbildung 81: Kalibrierkurven der Schwefelmessungen ($m/z = 32$; ^{32}S) des HSA-Standards mittels SEC und FIA (Element 2).	124
Abbildung 82: Vergleich der LC/ICP-MS Messungen ($m/z = 32$; ^{32}S) der Fließinjektionen des Anti-IL-8-Antikörpers in unterschiedlichen Verdünnungen (Element 2).	125

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte.....	34
Tabelle 2: Verwendete chromatographische Säulen.....	35
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.....	35
Tabelle 4: Verwendete Proteine.....	37
Tabelle 5: Verwendete Enzyme.....	37
Tabelle 6: Puffersysteme.....	38
Tabelle 7: Sonstige Materialien.....	38
Tabelle 8: Errechnete Molekülmasse des Anti-IL-8 Antikörpers bei verschiedenen Kollisionsenergien mit den jeweiligen Standardabweichungen (n = 7 für 10 bis 100 eV; n = 6 für 110 bis 140 eV).....	64
Tabelle 9: Überblick der Molekülmassen der einzelnen reduzierten bzw. Pr-MeCAT-Mal markierten Anti-IL-8-Antikörperfragmente und deren Massenunterschiede.....	91
Tabelle 10: Überblick der Markierungsgrade der einzelnen Pr-MeCAT-Mal markierten Antikörperfragmente aus den Messungen des reduzierten und des markierten Anti-IL-8-Antikörpers (siehe Tabelle 9).....	91
Tabelle 11: Überblick der Molekülmassen der einzelnen Anti-IL-8-Antikörperfragmente und der Massenunterschied durch die Markierung, die Masse des unmarkierten Antikörpers wurde durch Abzug der Masse der Alkylierungen vom entsprechenden Fragment erhalten.....	93
Tabelle 12: Überblick der Markierungsgrade der einzelnen Antikörperfragmente des markierten Anti-IL-8-Antikörpers, aus dem Vergleich des markierten und des alkylierten Antikörpers (siehe Tab. 16).....	94
Tabelle 13: Iodierungsgrade des Protein A nach der Iodierung mit Iod-Kaliumiodid.....	96
Tabelle 14: Massen der untersuchten Polymere.....	104
Tabelle 15: Wiederfindungen der eingesetzten Proteine bei den SEC-ICP-MS Messungen.....	114
Tabelle 16: Vergleich der berechneten Konzentrationen des Anti-IL-8-Antikörpers.....	114
Tabelle 17: Errechnete Masse des Anti-IL-8-Antikörpers unter Einbeziehung der Halbwertsbreiten.....	119
Tabelle 18: Errechnete Masse des deglykosylierten Anti-IL-8-Antikörpers bei verschiedenen Kollisionsenergien.....	121
Tabelle 19: Errechnete Massen des intakten Anti-IL-8-Antikörpers und dessen Fragmenten, sowie des deglykosylierten Antikörpers.....	122
Tabelle 20: Überblick der Markierungsgrade der untersuchten Antikörper.....	123

10. Literaturverzeichnis

- [1] E. von Behring, S. Kitasato; Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren; *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1890**, *16*, 1113-1114.
- [2] J. Lindemann; Origin of the Terms 'Antibody' and 'Antigen'; *Scand. J Immunol.* **1984**, *19*, 281-285.
- [3] P. Ehrlich; Experimentelle Untersuchungen über Immunität. II Ueber Abrin; *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1891**, *17*, 1218-1219.
- [4] L. Deutsch; Anticorps Typhiques; *Ann. Inst. Pasteur* **1899**, *13*, 6896-6894.
- [5] A. Tiselius, E. Kabat; An electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations; *J. Exp. Med.* **1939**, *69*, 119-131.
- [6] J. F. Heremans; Immunichemical Studies on Protein Pathology the Immunoglobulin Concept; *Clin. chim. Acta* **1959**, *4*, 639-646.
- [7] K. D. Elgert, *Immunology: Understanding The Immune System*, Wiley-Blackwell Hoboken, **1998**.
- [8] C. Schütt, B. Broker, *Grundwissen Immunologie*, 3 ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2011**.
- [9] J. H. Duffus, H. G. J. Worth, *Fundamental Toxicology* 2ed., Royal Society of Chemistry Cambridge, **2006**.
- [10] B. Lakshmi Narendra, K. Eshvendar Reddy, S. Shantikumar, S. Ramakrishna; Immune system: a double-edged sword in cancer; *Inflamm. Res.* **2013**, *62*, 823-834.
- [11] L. Deng, M. Luo, A. Velikovsky, R. A. Mariuzza; Structural insights into the evolution of the adaptive immune system; *Annu. Rev. Biophys.* **2013**, *42*, 191-215.
- [12] E. Rampler, T. Dalik, G. Stingeder, S. Hann, G. Koellensperger; Sulfur containing amino acids – challenge of accurate quantification; *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1018-1023.
- [13] R. M. Anthony, J. V. Ravetch; A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs; *J. Clin. Immunol.* **2010**, *30 Suppl 1*, S9-14.
- [14] H. W. Schroeder, Jr., L. Cavacini; Structure and function of immunoglobulins; *J. Allergy Clin. Immunol.* **2010**, *125*, S41-52.
- [15] F. Shakib, D. R. Stanworth; Human IgG Subclasses in Health and Disease Part I; *Ric. Clin. Lab.* **1980**, *10*, 463-479.
- [16] W. H. Organization; *Bull. Wld. Hlth. Org.* **1964**, *30*, 447-450.
- [17] H. G. Kunkel, J. L. Fahey, E. C. Franklin, E. F. Osserman, W. D. Terry; Terminology and Nomenclature: Notations for Human Immunoglobulin Subclasses; *Bull. Wld. Hlth. Org.* **1966**, *35*, 953.
- [18] F. Shakib, D. R. Stanworth; Human IgG Subclasses in Health and Disease Part II; *Ric. Clin. Lab.* **1980**, *10*, 561-580.
- [19] L. M. Amzel, R. J. Poljak; Three-dimensional Structure of Immunoglobulins; *Ann. Rev. Biochem.* **1979**, *48*, 961-997.
- [20] S. Endo, Y. Arata; Proton Nuclear Magnetic Resonance Study of Human Immunoglobulins G 1 and Their Proteolytic Fragments: Structure of the Hinge Region and Effects of a Hinge-Region Deletion on Internal Flexibility; *Biochemistry* **1985**, *24*, 1561-1568.
- [21] R. Pumphrey; Computer models of the human immunoglobulins: Shape and segmental flexibility; *Immunol. Today* **1986**, *7*, 174-178.
- [22] D. Moiani, M. Salvalaglio, C. Cavallotti, A. Bujacz, I. Redzynia, G. Bujacz, F. Dinon, P. Pengo, G. Fassina; Structural Characterization of a Protein A Mimetic Peptide Dendrimer Bound to Human IgG; *J. Phys. Chem. B* **2009**, *113*, 16268-16275.
- [23] K. J. Hamblett, P. D. Senter, D. F. Chace; Effects of Drug Loading on the Antitumor Activity of a Monoclonal Antibody Drug Conjugate; *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7063-7070.

- [24] H. Aono, D. Wen, L. Zang, D. Houde, R. B. Pepinsky, D. R. Evans; Efficient on-column conversion of IgG1 trisulfide linkages to native disulfides in tandem with Protein A affinity chromatography; *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 5225-5232.
- [25] S. Gu, D. Wen, P. H. Weinreb, Y. Sun, L. Zhang, S. F. Foley, R. Kshirsagar, D. Evans, S. Mi, W. Meier, R. B. Pepinsky; Characterization of trisulfide modification in antibodies; *Anal. Biochem.* **2010**, 400, 89-98.
- [26] J. Deisenhofer; Crystallographic Refinement and Atomic Models of a Human Fc Fragment and Its Complex with Fragment B of Protein A from *Staphylococcus aureus* at 2.9- and 2.8-Å Resolution; *Biochemistry* **1981**, 20, 2361-2370.
- [27] K. Masuda, Y. Yamaguchi, K. Kato, N. Takahashi, I. Shimada, Y. Arata; Pairing of oligosaccharides in the Fc region of immunoglobulin G; *FEBS Lett.* **2000**, 473, 349-357.
- [28] E. O. Saphire, R. L. Stanfield, M. D. Max Crispin, P. W. H. I. Parren, P. M. Rudd, R. A. Dwek, D. R. Burton, I. A. Wilson; Contrasting IgG Structures Reveal Extreme Asymmetry and Flexibility; *J. Mol. Biol.* **2002**, 319, 9-18.
- [29] H. Liu, G. G. Bulseco, J. Sun; Effect of posttranslational modifications on the thermal stability of a recombinant monoclonal antibody; *Immunol. Lett.* **2006**, 106, 144-153.
- [30] R. B. Parekh, R. A. Dwek, B. J. Sutton, D. L. Fernandes, A. Leung, D. Stanworth, T. W. Rademacher, T. Mizuochi, T. Taniguchi, K. Matsuta, F. Takeuchi, Y. Nagano, T. Miyamoto, A. Kobata; Association of rheumatoid arthritis and primary osteoarthritis with changes in the glycosylation pattern of total serum IgG; *Nature* **1985**, 316, 452-457.
- [31] Y. Mimura, S. Church, R. Ghirlando, R. P. Ashton, S. Dong, M. Goodall, J. Lund, R. Jefferis; The influence of glycosylation on the thermal stability and effector function expression of human IgG1-Fc: properties of a series of truncated glycoforms; *Mol. Immunol.* **2002**, 37, 697-706.
- [32] S. Frutiger, G. J. Hughes, W. C. Hanly, J. Jaton; Rabbit Secretory Components of Different Allotypes Vary in Their Carbohydrate Content and Their Sites of N-Linked Glycosylation; *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 29005-29011.
- [33] F. Wold; In Vivo Chemical Modifications of Proteins (Post-Translational Modifications); *Ann. Rev. Biochem.* **1981**, 50, 783-814.
- [34] B. Antes, S. Amon, A. Rizzi, S. Wiederkum, M. Kainer, O. Szolar, M. Fido, R. Kircheis, A. Nechansky; Analysis of lysine clipping of a humanized Lewis-Y specific IgG antibody and its relation to Fc-mediated effector function; *J. Chromatogr. B* **2007**, 852, 250-256.
- [35] R. J. Harris; Processing of C-terminal lysine and arginine residues of proteins isolated from mammalian cell culture; *J. Chromatogr. A* **1995**, 705, 129-134.
- [36] D. Reusch, M. Habeger, M. H. Selman, P. Bulau, A. M. Deelder, M. Wuhrer, N. Engler; High-throughput work flow for IgG Fc-glycosylation analysis of biotechnological samples; *Anal. Biochem.* **2013**, 432, 82-89.
- [37] M. Tashiro, G. T. Montelione; Structures of bacterial immunoglobulin-binding domains and their complexes with immunoglobulins *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, 5, 471-481.
- [38] E. V. Sidorin, T. F. Solov'eva; IgG-binding proteins of bacteria; *Biochemistry (Mosc.)* **2011**, 76, 295-308.
- [39] A. Makaraviciute, A. Ramanaviciene; Site-directed antibody immobilization techniques for immunosensors; *Biosens. Bioelectron.* **2013**, 50, 460-471.
- [40] M. Hutt, A. Farber-Schwarz, F. Unverdorben, F. Richter, R. E. Kontermann; Plasma half-life extension of small recombinant antibodies by fusion to immunoglobulin-binding domains; *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 4462-4469.
- [41] B.-M. Kihlberg, M. Collin, A. Olsen, L. Björck; Protein H, an Antiphagocytic Surface Protein in *Streptococcus pyogenes*; *Infect. Immun.* **1999**, 67, 1708-1714.
- [42] P. R. Widders, L. A. Dorrance, M. Yarnall, L. B. Corbeil; Immunoglobulin-Binding Activity among Pathogenic and Carrier Isolates of *Haemophilus somnus*; *Infect. Immun.* **1989**, 57, 639-642.
- [43] P. Åkesson, J. Cooney, F. Kishimoto, L. Björck; Protein H-A Noval IgG Binding Bacterial Protein; *Mol. Immunol.* **1990**, 27, 523-531.

- [44] W. W. Navarre, O. Schneewind; Surface Proteins of Gram-Positive Bacteria and Mechanisms of Their Targeting to the Cell Wall Envelope; *Microbiol. Mol. Biol.* **1999**, *63*, 174-229.
- [45] M. Linhult, S. Gulich, T. Graslund, A. Simon, M. Karlsson, A. Sjöberg, K. Nord, S. Hober; Improving the tolerance of a protein a analogue to repeated alkaline exposures using a bypass mutagenesis approach; *Proteins* **2004**, *55*, 407-416.
- [46] R. Li, V. Dowd, D. J. Stewart, S. J. Burton, C. R. Lowe; Design, synthesis, and application of a Protein A mimetic; *Nat. Biotechnol.* **1998**, *16*, 190-195.
- [47] S. Hober, K. Nord, M. Linhult; Protein A chromatography for antibody purification; *J. Chromatogr. B* **2007**, *848*, 40-47.
- [48] R. Hahn, R. Schlegel, A. Jungbauer; Comparison of protein A affinity sorbents; *J. Chromatogr. B* **2003**, *790*, 35-51.
- [49] S. Gülich, M. Linhult, S. Ståhl, S. Hober; Engineering streptococcal protein G for increased alkaline stability; *Protein Eng.* **2002**, *15*, 835-842.
- [50] G. Köhler, C. Milstein; Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity; *Nature* **1975**, *256*, 495-497.
- [51] S. L. Morrison, M. J. Johnson, L. A. Herzenberg, V. T. Oi; Chimeric human antibody molecules: Mouse antigen-binding domains with human constant region domains; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6851-6855.
- [52] G. L. Boulianne, N. Hozumi, M. J. Shulman; Production of functional chimaeric mouse/human antibody; *Nature* **1984**, *312*, 643-646.
- [53] S. P. C. Cole, B. G. Campling, T. Atlaw, D. Kozbor, J. C. Roder; Human monoclonal antibodies; *Mol. Cell. Biochem* **1984**, *62*, 109-120.
- [54] R. Jefferis, C. B. Reimer, F. Skvaril, G. de Lange, N. R. Ling, J. Lowe, M. R. Walker, D. J. Phillips, C. H. Aloisio, T. W. Wells, J. P. Vaerman, C. G. Magnusson, H. Kubagawa, M. Cooper, F. Vartdal, B. Vandvik, J. J. Haaijman, O. Makela, A. Sarnesto, Z. Lando, J. Gergely, E. Rajnavölgyi, G. Laszlo, J. Radl, G. A. Molinaro; Evaluation of monoclonal antibodies having specificity for human IgG sub-classes: results of an IUIS/WHO collaborative study; *Immunol. Lett.* **1985**, *10*, 233-252.
- [55] R. G. Hamilton; Human IgG Subclasses Measurements in the Clinical Laboratory; *Clin. Chem.* **1987**, *33*, 1707-1725.
- [56] G. P. Adams, L. M. Weiner; Monoclonal antibody therapy of cancer; *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1147-1157.
- [57] J. M. Reichert, C. J. Rosensweig, L. B. Faden, M. Dewitz, C.; Monoclonal antibody successes in the clinic; *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1073-1078.
- [58] P. J. Carter; Potent antibody therapeutics by design; *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6*, 343-357.
- [59] L. S. Winterfield, A. Menter; Infliximab; *Dermatol. Ther.* **2004**, *17*, 409-426.
- [60] W. Wang, L. Fan, D. Xu, Z. Wen, R. Yu, Q. Ma; Immunotherapy for Alzheimer's disease; *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2012**, *44*, 807-814.
- [61] F. Shakib, D. R. Stanworth; IgG subclass composition of rheumatoid arthritic sera and joint fluids; *Ann. rheum. Dis.* **1976**, *35*, 263-266.
- [62] F. Shakib, D. R. stanworth; Antigammaglobulin (rheumatoid factor) activity of human IgG subclasses; *Ann. rheum. Dis.* **1978**, *37*, 12-17.
- [63] H. Watanabe, A. Satake, Y. Kido, A. Tsuji; Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices; *The Analyst* **2002**, *127*, 98-103.
- [64] D. J. Slamon, W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich, M. F. Press; Studies of the HER-2/neu Proto-oncogene in Human Breast and Ovarian Cancer; *Science* **1989**, *244*, 707-712.
- [65] B. Z. Ring, R. S. Seitz, R. Beck, W. J. Shasteen, S. M. Tarr, M. C. Cheang, B. J. Yoder, G. T. Budd, T. O. Nielsen, D. G. Hicks, N. C. Estopinal, D. T. Ross; Novel prognostic immunohistochemical biomarker panel for estrogen receptor-positive breast cancer; *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 3039-3047.

- [66] C. Hempen, U. Karst; Labeling strategies for bioassays; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 572-583.
- [67] C. Giesen, T. Mairinger, L. Khoury, L. Waentig, N. Jakubowski, U. Panne; Multiplexed immunohistochemical detection of tumor markers in breast cancer tissue using laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry; *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8177-8183.
- [68] L. Waentig, N. Jakubowski, S. Hardt, C. Scheler, P. H. Roos, M. W. Linscheid; Comparison of different chelates for lanthanide labeling of antibodies and application in a Western blot immunoassay combined with detection by laser ablation (LA-)ICP-MS; *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1311-1320.
- [69] T. M. Corneillie, P. A. Whetstone, A. J. Fisher, C. F. Meares; A Rare Earth-DOTA-Binding Antibody: Probe Properties and Binding Affinity across the Lanthanide Series; *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 3436-3437.
- [70] G. Schwarz, L. Mueller, S. Beck, M. W. Linscheid; DOTA based metal labels for protein quantification: A review; *J. Anal. At. Spectrom.* **2014**, *29*, 221-233.
- [71] N. Jakubowski, L. Waentig, H. Hayen, A. Venkatachalam, A. von Bohlen, P. H. Roos, A. Manz; Labelling of proteins with 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid and lanthanides and detection by ICP-MS; *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 1497-1507.
- [72] R. Ahrends, S. Pieper, A. Kühn, H. Weisshoff, M. Hamester, T. Lindemann, C. Scheler, K. Lehmann, K. Taubner, M. W. Linscheid; A Metal-coded Affinity Tag Approach to Quantitative Proteomics; *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1907-1916.
- [73] G. Schwarz, S. Beck, M. G. Weller, M. W. Linscheid; MeCAT--new iodoacetamide reagents for metal labeling of proteins and peptides; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 1203-1209.
- [74] X. Lou, G. Zhang, I. Herrera, R. Kinach, O. Ornatsky, V. Baranov, M. Nitz, M. A. Winnik; Polymer-based elemental tags for sensitive bioassays; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 6111-6114.
- [75] S. D. Tanner, D. R. Bandura, O. Ornatsky, V. I. Baranov, M. Nitz, M. A. Winnik; Flow cytometer with mass spectrometer detection for massively multiplexed single-cell biomarker assay; *Pure Appl. Chem.* **2008**, *80*, 2627-2641.
- [76] L. Waentig, P. H. Roos, N. Jakubowski; Labelling of antibodies and detection by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry : PART III. Optimization of antibody labelling for application in a Western blot procedure; *J. Anal. At. Spectrom.* **2009**, *24*, 924-933.
- [77] N. E. Thompson, K. M. Foley, E. S. Stalder, R. R. Burgess; Chapter 28 Identification, Production, and Use of Polyol-Responsive Monoclonal Antibodies for Immunoaffinity Chromatography; **2009**, *463*, 475-494.
- [78] M. Baggiolini, B. Dewald, B. Moser; Human Chemokines: An Update; *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15*, 675-705.
- [79] D. J. Brat, A. C. Bellail, E. G. Van Meir; The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis; *Neuro Oncol.* **2005**, *7*, 122-133.
- [80] A. Krupa, H. Kato, M. A. Matthay, A. K. Kurdowska; Proinflammatory activity of anti-IL-8 autoantibody:IL-8 complexes in alveolar edema fluid from patients with acute lung injury; *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2004**, *286*, L1105-1113.
- [81] A. K. Kurdowska, E. J. Miller, A. B. Cohen; An Anti-Interleukin 8 Monoclonal Antibody That Interferes with the Binding of Interleukin 8 to Cellular Receptors and the Activation of Human Blood Neutrophils; *Hybridoma* **1995**, *14*, 225-233.
- [82] F. M. Brennan, C. O. C. Zachariae, D. Chantry, C. G. Larsen, M. Turner, R. N. Mainia, K. Matsushima, M. Feldmann; Detection of interleukin 8 biological activity in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and production of interleukin 8 mRNA by isolated synovial cells *Eur. J. Immunol.* **1990**, *20*, 2141-2144.
- [83] K. J. Van Zee, ZEE, L. E. Deforge, E. Fischer, M. A. Marano, J. S. Kenney, D. G. Remick, S. F. Lowry, L. L. Moldawer; IL-8 in Septic Shock, Endotoxemia IL-1 Administration; *J. Immunol. Methods* **1991**, *146*, 3478-3482.

- [84] M. Stricherling, E. Bornscheuer, J. M. Schröder, E. Christophers; Localization of Neutrophil-Activating Peptide-1/Interleukin-8-Immunoreactivity in Normal and Psoriatic Skin; *J. Invest. Dermatol.* **1991**, *96*, 26-30.
- [85] A. K. Kurdowska, E. J. Miller, J. M. Noble, R. P. Baughman, M. A. Matthay, W. G. Brelsford, A. B. Cohen; Anti-IL-8 autoantibodies in alveolar, fluid from patients with the adult respiratory distress syndrome; *J. Immunol.* **1996**, *215*, 2699-2706.
- [86] R. Fudala, A. Krupa, D. Stankowska, T. C. Allen, A. K. Kurdowska; Anti-interleukin-8 autoantibody:interleukin-8 immune complexes in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome; *Clin. Sci.* **2008**, *114*, 403-412.
- [87] T. C. Allen, R. Fudala, S. E. Nash, A. K. Kurdowska; Anti-Interleukin 8 Autoantibody:Interleukin 8 Immune Complexes Visualized by Laser Confocal Microscopy in Injured Lung (Colocalization With FcγRIIa in Lung Tissue From Acute Respiratory Distress Syndrome Patients); *Arch. Pathol. Lab Med.* **2007**, *131*, 452-456.
- [88] P. Peichl, E. Pursch, H. Bröll, I. J. D. Lindley; Anti-IL-8 autoantibodies and complexes in rheumatoid arthritis: polyclonal activation in chronic synovial tissue inflammation; *Rheumatol. Int.* **1999**, *18*, 141-145.
- [89] W. H. Bragg; The Analysis of Crystal Structures by X-Rays; *Science* **1924**, *60*, 139-149.
- [90] A. R. Sanderson, M. G. Lanning; Crystalline Fc prepared in High Yield from Normal Human IgG; *Nature* **1970**, *226*, 356-358.
- [91] E. C. Franklin; Structural Studies of Human 7S γ-Globulin (G Immunoglobulin); *J. Exp. Med.* **1964**, *120*, 691-709.
- [92] E. O. Saphire, P. W. H. I. Parren, C. F. Barbas III, D. R. Burton, I. A. Wilson; Crystallization and preliminary structure determination of an intact human immunoglobulin, b12: an antibody that broadly neutralizes primary isolates of HIV-1; *Acta Cryst.* **2001**, *D57*, 168-171.
- [93] P. Kolenko, J. Dohnalek, J. Duskova, T. Skalova, R. Collard, J. Hasek; New insights into intra- and intermolecular interactions of immunoglobulins: crystal structure of mouse IgG2b-Fc at 2.1-Å resolution; *Immunology* **2008**, *126*, 378-385.
- [94] Y. Wang, A. Lomakin, T. Hideshima, J. P. Laubach, O. Ogun, P. G. Richardson, N. C. Munshi, K. C. Anderson, G. B. Benedek; Pathological crystallization of human immunoglobulins; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 13359-13361.
- [95] A. L. Shapiro, M. J. V. Jr.; Molecular Weight Estimation of Polypeptides by SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis: Further Data Concerning Resolving Power and General Considerations; *Anal. Biochem.* **1969**, *29*, 505-514.
- [96] Y. S. Choi, R. A. Good; Development of Chicken Lymphoid System: I Synthesis and Secretion of Immunoglobulins by Chicken Lymphoid Cells; *J. Exp. Med.* **1972**, *135*, 1133-1150.
- [97] K. Kato, C. Matsunaga, A. Odaka, S. Yamato, W. Takaha, I. Shimada, Y. Arata; Carbon-13 NMR Study of Switch Variant Anti-Dansyl Antibodies: Antigen Binding and Domain-Domain Interactions; *Biochemistry* **1991**, *30*, 6604-6610.
- [98] H. Kim, K. Kato, A. Higuchi, N. Nomura, H. Noguchi, Y. Arata; ¹³C-NMR spectral analysis of the structures of mouse immunoglobulin G1 carrying allotypes a and j; *J. Immunol. Methods* **1992**, *153*, 223-227.
- [99] H. T. W., T. T. Yip; New Desorption Strategies for the Mass Spectrometric Analysis of Macromolecules; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 576-580.
- [100] M. M. Siegel, I. J. Hollander, P. R. Hamann, J. P. James, L. Hinman, B. S. Smith, A. P. H. Farnsworth, A. Phipps, D. J. King, M. Karas, A. Ingendoh, F. Hillenkamp; Matrix-Assisted UV-Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometric Analysis of Monoclonal Antibodies for the Determination of Carbohydrate, Conjugated Chelator, and Conjugated Drug Content; *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 2470-2481.
- [101] M. Adamczyk, J. C. Gebler, J. Wu; Papain digestion of different mouse IgG subclasses as studied by electrospray mass spectrometry; *J. Immunol. Methods* **2000**, *237*, 95-104.

- [102] M. W. Pinkse, C. S. Maier, J. I. Kim, B. H. Oh, A. J. Heck; Macromolecular assembly of *Helicobacter pylori* urease investigated by mass spectrometry; *J. Mass Spectrom.* **2003**, *38*, 315-320.
- [103] I. Michaelievski, M. Eisenstein, M. Sharon; Gas-Phase Compaction and Unfolding of Protein Structures; *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9484-9491.
- [104] A. J. Heck; Native mass spectrometry: a bridge between interactomics and structural biology; *Nat. Methods* **2008**, *5*, 927-933.
- [105] S. Warnke, G. von Helden, K. Pagel; Protein structure in the gas phase: the influence of side-chain microsolvation; *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1177-1180.
- [106] K. B. Shelimov, D. E. Clemmer, R. R. Hudgins, M. F. Jarrold; Protein Structure *in Vacuo*: Gas-Phase Conformations of BPTI and Cytochrome *c*; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 2240-2248.
- [107] Y. Mao, M. A. Ratner, M. F. Jarrold; Molecular Dynamics Simulations of the Charge-Induced Unfolding and Refolding of Unsolvated Cytochrome *c*; *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 10017-10021.
- [108] R. H. H. van den Heuvel, E. van Duijn, H. Mazon, S. A. Synowsky, K. Lorenzen, C. Versluis, S. J. J. Brouns, D. Langridge, J. van der Oost, J. Hoyes, A. J. R. Heck; Improving the Performance of a Quadrupole Time-of-Flight Instrument for Macromolecular Mass Spectrometry; *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 7473-7483.
- [109] J. F. Valliere-Douglass, W. A. McFee, O. Salas-Solano; Native intact mass determination of antibodies conjugated with monomethyl Auristatin E and F at interchain cysteine residues; *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 2843-2849.
- [110] R. J. Rose, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A. J. Heck; High-sensitivity Orbitrap mass analysis of intact macromolecular assemblies; *Nat. Methods* **2012**, *9*, 1084-1086.
- [111] J. A. Burns, J. C. Butler, J. Moran, G. M. Whitesides; Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-carboxyethyl)phosphine; *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 2648-2650.
- [112] X. Li, F. Wang, W. Xu, K. May, D. Richardson, H. Liu; Disulfide bond assignment of an IgG1 monoclonal antibody by LC-MS with post-column partial reduction; *Anal. Biochem.* **2013**, *436*, 93-100.
- [113] J. Ahn, M. J. Cao, Y. Q. Yu, J. R. Engen; Accessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases; *Biochim. Biophys. Acta* **2013**, *1834*, 1222-1229.
- [114] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik*, 2 ed., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2006**.
- [115] H. P. Treffers, M. Heidelberger; Quatitative Experiments with Antibodies to a Specific Precipitate; *J. Exp. Med.* **1941**, *73*, 125-140.
- [116] S. Kittipongwarakarn, A. Hawe, R. Tantipolphan, K. Limsuwun, S. Khomvilai, S. Puttipatkhachorn, W. Jiskoot; New method to produce equine antirabies immunoglobulin F(ab')(2) fragments from crude plasma in high quality and yield; *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2011**, *78*, 189-195.
- [117] J. Gergely, G. A. Medgyesi, D. R. Stanworth; Struchtral Studies of Immunoglobulins-II The Varying Susceptibility to Papain-Digestion of a Group of Human Myeloma γ G-Globulins; *Immunochemistry* **1967**, *4*, 369-374.
- [118] K. L. Bennett, S. V. Smith, R. J. W. Truscott, M. M. Sheil; Monitoring Papain Digestion of a Monoclonal Antibody by Electrospray Ionization Mass Spectrometry; *Anal. Biochem.* **1997**, *245*, 17-27.
- [119] Y. Du, K. May, W. Xu, H. Liu; Detection and quantitation of afucosylated N-linked oligosaccharides in recombinant monoclonal antibodies using enzymatic digestion and LC-MS; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 1241-1249.
- [120] A. Schuchert-Shi, P. C. Hauser; Peptic and tryptic digestion of peptides and proteins monitored by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection; *Anal. Biochem.* **2009**, *387*, 202-207.

- [121] A. P. Navaza, J. R. Encinar, A. Ballesteros, J. M. González, A. Sanz-Medel; Capillary HPLC-ICPMS and Tyrosine Iodination for the Absolute Quantification of Peptides Using Generic Standards; *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5390-5399.
- [122] G. Espuna, A. Andreu, J. Barluenga, X. Pérez, A. Planas, G. Arsequell, G. Valencia; Iodination of Proteins by IPy₂BF₄, a New Tool in Protein Chemistry; *Biochemistry* **2006**, *45*, 5957-5963.
- [123] A. G. Gornall, C. J. Bardawill, M. M. David; Determination of Serum Proteins by Means of the Biuret Reaction; *J. Biol. Chem.* **1949**, *177*, 751-766.
- [124] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, L. Farr, R. J. Randall; Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent; *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265-275.
- [125] N. Lindeboom, P. K. J. P. D. Wanasundara; Interference of phenolic compounds in Brassica napus, Brassica rapa and Sinapis alba seed extracts with the Lowry protein assay; *Food Chem.* **2007**, *104*, 30-38.
- [126] P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk; Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid; *Anal. Biochem.* **1985**, *150*, 76-85.
- [127] M. M. Bradford; A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding; *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-254.
- [128] T. Zor, Z. Selinger; Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies; *Anal. Biochem.* **1996**, *236*, 302-308.
- [129] A. Ganesh, J. Lin; Comparisons of protein extraction procedures and quantification methods for the proteomic analysis of Gram-positive Paenibacillus sp. strain D9; *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *27*, 1669-1678.
- [130] K. R. Kozak, S. P. Tsai, A. Fourie-O'Donohue, J. dela Cruz Chuh, L. Roth, R. Cook, E. Chan, P. Chan, M. Darwish, R. Ohri, H. Raab, C. Zhang, K. Lin, W. L. Wong; Total antibody quantification for MMAE-conjugated antibody-drug conjugates: impact of assay format and reagents; *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 772-779.
- [131] J. Horak, A. Ronacher, W. Lindner; Quantification of immunoglobulin G and characterization of process related impurities using coupled protein A and size exclusion high performance liquid chromatography; *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 5092-5102.
- [132] C. Rappel, D. Schaumlöffel; The role of sulfur and sulfur isotope dilution analysis in quantitative protein analysis; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *390*, 605-615.
- [133] S. Diez Fernandez, N. Sugishama, J. Ruiz Encinar, A. Sanz-Medel; Triple quad ICPMS (ICPQQQ) as a new tool for absolute quantitative proteomics and phosphoproteomics; *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5851-5817.
- [134] J. Bettmer, M. Montes Bayon, J. R. Encinar, M. L. Fernandez Sanchez, R. Fernandez de la Campa Mdel, A. Sanz Medel; The emerging role of ICP-MS in proteomic analysis; *J. Proteomics* **2009**, *72*, 989-1005.
- [135] M. Wind, A. Wegener, A. Eisenmenger, R. Kellner, W. D. Lehmann; Sulfur as the key element for quantitative protein analysis by capillary liquid chromatography coupled to element mass spectrometry; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, *42*, 3425-3427.
- [136] J. R. Birch, A. J. Racher; Antibody production; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 671-685.
- [137] P. A. Marichal-Gallardo, M. M. Alvarez; State-of-the-art in downstream processing of monoclonal antibodies: process trends in design and validation; *Biotechnol. Prog.* **2012**, *28*, 899-916.
- [138] K. Swinnen, A. Krul, I. Van Goidsenhoven, N. Van Tichelt, A. Roosen, K. Van Houdt; Performance comparison of protein A affinity resins for the purification of monoclonal antibodies; *J. Chromatogr. B* **2007**, *848*, 97-107.
- [139] B. Kelly; Very Large Scale Monoclonal Antibody Purification: The Case for Conventional Unit Operations; *Biotechnol. Prog.* **2007**, *23*, 995-1008.
- [140] U. Gottschalk, *Process Scale Purification of Antibodies*, John Wiley & Sons, Inc Hoboken, **2009**.

- [141] C. Jiang, J. Liu, M. Rubacha, A. A. Shukla; A mechanistic study of Protein A chromatography resin lifetime; *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 5849-5855.
- [142] B. L. Johannsson, C. Ellström; Column lifetime of a new agarose medium for high-performance gel filtration chromatography at basic pH; *J. Chromatogr. A* **1985**, 330, 360-364.
- [143] B. L. Johannsson; Column lifetime of Superose 6 at 37°C and basic pH; *J. Chromatogr. A* **1986**, 351, 136-139.
- [144] K. Brorson, J. Brown, E. Hamilton, K. E. Stein; Identification of protein A media performance attributes that can be monitored as surrogates for retrovirus clearance during extended re-use; *J. Chromatogr. A* **2003**, 989, 155-163.
- [145] U. Gottschalk, *Process Scale Purification of Antibodies*, John Wiley & Sons, Inc Hoboken, **2009**.
- [146] D. Low, R. O'Leary, N. S. Pujar; Future of antibody purification; *J. Chromatogr. B* **2007**, 848, 48-63.
- [147] P. Gagnon; Technology trends in antibody purification; *J. Chromatogr. A* **2012**, 1221, 57-70.
- [148] P. Gagnon, F. Hensel, S. Lee, S. Zaidi; Chromatographic behavior of IgM:DNA complexes; *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 2405-2412.
- [149] N. Bereli, L. Uzun, H. Yavuz, A. Elkak, A. Denizli; Antibody purification using porous metal-chelated monolithic columns; *J. Appl. Polym. Sci.* **2006**, 101, 395-404.
- [150] S. Aldington, J. Bonnerjea; Scale-up of monoclonal antibody purification processes; *J. Chromatogr. B* **2007**, 848, 64-78.
- [151] A. D. Naik, S. Menegatti, P. V. Gurgel, R. G. Carbonell; Performance of hexamer peptide ligands for affinity purification of immunoglobulin G from commercial cell culture media; *J. Chromatogr. A* **2011**, 1218, 1691-1700.
- [152] S. J. Mountford, E. M. Campi, A. J. Robinson, M. T. W. Hearn; Synthesis of N-heterocyclic ligands for use in affinity and mixed mode chromatography; *Tetrahedron* **2011**, 67, 471-485.
- [153] G. K. Ehrlich, P. Bailon; Identification of peptides that bind to the constant region of a humanized IgG₁ monoclonal antibody using phage display; *J. Mol. Recognit.* **1998**, 11, 121-125.
- [154] G. K. Ehrlich, P. Bailon; Identification of model peptides as affinity ligands for the purification of humanized monoclonal antibodies by means of phage display; *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, 49, 443-454.
- [155] P. Bellofiore, F. Petronzelli, T. De Martino, O. Minenkova, V. Bombardi, A. M. Anastasi, R. Lindstedt, F. Felici, R. De Santis, A. Verdoliva; Identification and refinement of a peptide affinity ligand with unique specificity for a monoclonal anti-tenascin-C antibody by screening of a phage display library; *J. Chromatogr. A* **2006**, 1107, 182-191.
- [156] A. Verdoliva, F. Pannone, M. Rossi, S. Catello, V. Manfredi; Affinity purification of polyclonal antibodies using a new all-D synthetic peptide ligand: comparison with protein A and protein G; *J. Immunol. Methods.* **2002**, 271, 77-88.
- [157] G. Fassina, A. Verdoliva, G. Palombo, M. Ruvo, G. Cassani; Immunoglobulin specificity of TG19318: a novel synthetic ligand for antibody affinity purification; *J. Mol. Recognit.* **1998**, 11, 128-133.
- [158] A. F. Tominey, J. Liese, S. Wei, K. Kowski, T. Schrader, A. Kraft; RAFT polymers for protein recognition; *Beilstein J. Org. Chem.* **2010**, 6.
- [159] P. Latza, P. Gilles, T. Schaller, T. Schrader; Affinity polymers tailored for the protein a binding site of immunoglobulin G proteins; *Chem. Eur. J.* **2014**, 20, 11479-11487.
- [160] G. Fassina, A. Verdoliva, M. R. Odierna, M. Ruvo, G. Cassani; Protein A Mimetic Peptide Ligand for Affinity Purification of Antibodies; *J. Mol. Recognit.* **1996**, 9, 564-569.
- [161] E. L. Pfaumiller, M. L. Paulemond, C. M. Dupper, D. S. Hage; Affinity monolith chromatography: a review of principles and recent analytical applications; *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 2133-2145.

- [162] G. Palombo, M. Rossi, G. Cassani, G. Fassina; Affinity purification of mouse monoclonal IgE using a protein A mimetic ligand (TG19318) immobilized on solid supports; *J. Mol. Recognit.* **1998**, *11*, 247-249.
- [163] M. Ulbricht; Membrane separations using molecularly imprinted polymers; *J. Chromatogr. B* **2004**, *804*, 113-125.
- [164] D. Yin, M. Ulbricht; Protein-selective adsorbers by molecular imprinting via a novel two-step surface grafting method; *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 3209-3219.
- [165] S. Schwark, M. Ulbricht; Toward protein-selective membrane adsorbers: A novel surface-selective photo-grafting method; *Eur. Polym. J.* **2012**, *48*, 1914-1922.
- [166] M. Glad, O. Norrlöw, B. Sellergren, N. Siegbahn, K. Mosbach; Use of Silane Monomers for Molecular Imprinting and Enzyme Entrapment in Polysiloxane-Coated Porous Silica; *J. Chromatogr. A* **1985**, *347*, 11-23.
- [167] A. Rachkov, N. Minoura; Towards molecularly imprinted polymers selective to peptides and proteins. The epitope approach; *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1544*, 255-266.
- [168] M. M. Titirici, A. J. Hall, B. Sellergren; Hierarchical Imprinting Using Crude Solid Phase Peptide Synthesis Products as Templates; *Chem. Mater.* **2003**, *15*, 822-824.
- [169] H. Nishino, C. S. Huang, K. J. Shea; Selective protein capture by epitope imprinting; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2392-2396.
- [170] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse; Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules; *Science* **1989**, *246*, 64-71.
- [171] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse; Electrospray ionization-principles and practice; *Mass Spectrom. Rev.* **1990**, *9*, 37-70.
- [172] M. Dole, L. L. Mack, R. L. Hines, R. C. Mobley, L. D. Ferguson; Molecular Beams of Macroions; *J. Chem. Phys.* **1968**, *49*, 2240-2249.
- [173] J. V. Iribarne, B. A. Thomson; On the evaporation of small ions from charged droplets; *J. Chem. Phys.* **1976**, *64*, 2287-2294.
- [174] T. D. Wood, M. A. Moy, A. R. Dolan, P. M. Bigwarfe Jr, T. P. White, D. R. Smith, D. J. Higbee; Miniaturization of Electrospray Ionization Mass Spectrometry; *Appl. Spectrosc. Rev.* **2003**, *38*, 187-244.
- [175] M. Wilm, M. Mann; Analytical Properties of the Nanoelectrospray Ion Source; *Anal. Chem.* **1996**, *68*, 1-8.
- [176] M. Wilm, M. Mann; Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last?; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* **1994**, *136*, 167-180.
- [177] K. Benkestock, G. Sundqvist, P. O. Edlund, J. Roeraade; Influence of droplet size, capillary-cone distance and selected instrumental parameters for the analysis of noncovalent protein-ligand complexes by nano-electrospray ionization mass spectrometry; *J. Mass Spectrom.* **2004**, *39*, 1059-1067.
- [178] I. V. Chernushevich, B. A. Thomson; Collisional Cooling of Large Ions in Electrospray Mass Spectrometry; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1754-1760.
- [179] A. N. Krutchinsky, I. V. Chernushevich, V. L. Spicer, W. Ens, K. G. Standing; Collisional Damping Interface for an Electrospray Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **1998**, *9*, 569-579.
- [180] N. Tahallah, M. W. Pinkse, C. S. Maier, A. J. Heck; The effect of the source pressure on the abundance of ions of noncovalent protein assemblies in an electrospray ionization orthogonal time-of-flight instrument; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2001**, *15*, 596-601.
- [181] A. Schmidt, U. Bahr, M. Karas; Influence of Pressure in the First Pumping Stage on Analyte Desolvation and Fragmentation in Nano-ESI MS; *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 6040-6046.
- [182] B. Kukrer, V. Filipe, E. van Duijn, P. T. Kasper, R. J. Vreeken, A. J. Heck, W. Jiskoot; Mass spectrometric analysis of intact human monoclonal antibody aggregates fractionated by size-exclusion chromatography; *Pharm. Res.* **2010**, *27*, 2197-2204.
- [183] M. Karas, U. Bahr; Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry; *Mass Spectrom. Rev.* **1991**, *10*, 335-357.

- [184] M. Karas, M. Glückmann, J. Schäfer; Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: singly charged molecular ions are the lucky survivors; *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1-12.
- [185] R. Knochenmuss; Photoionization Pathways and Free Electrons in UV-MALDI; *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 3179-3184.
- [186] R. S. Houk, V. A. Fassel, G. D. Flesch, H. J. Svec, A. L. Gray, C. E. Taylor; Inductively Coupled Argon Plasma as an Ion Source for Mass Spectrometric Determination of Trace Elements; *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2283-2289.
- [187] M. Wang, W. Y. Feng, Y. L. Zhao, Z. F. Chai; ICP-MS-based strategies for protein quantification; *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 326-348.
- [188] H. Wildner; Application of inductively coupled plasma sector field mass spectrometry for the fast and sensitive determination and isotope ratio measurement of non-metals in high-purity process chemicals; *J. Anal. At. Spectrom.* **1998**, *13*, 573-578.
- [189] T. Prohaska, C. Latkoczy, G. Stingeder; Precise sulfur isotope ratio measurements in trace concentration of sulfur by inductively coupled plasma double focusing sector field mass spectrometry; *J. Anal. At. Spectrom.* **1999**, *14*, 1501-1504.
- [190] B. Divjak, W. Goessler; Ion chromatographic separation of sulfur-containing inorganic anions with an ICP-MS as element-specific detector; *J. Chromatogr. A* **1999**, *844*, 161-169.
- [191] A. R. Date, A. L. Gray; Development Progress in Plasma Source Mass Spectrometry; *Analyst* **1983**, *108*, 159-165.
- [192] N. I. Ward, F. R. Abou-Shakra, S. F. Durrant; Trace Elemental Content of Biological Materials: A Comparison of NAA and ICP-MS Analysis; *Biol. Trace Elem. Res.* **1990**, *26-27*, 177-187.
- [193] D. Günther, I. Horn, B. Hattendorf; Recent trends and developments in laser ablation-ICP-mass spectrometry; *Fresenius J. Anal. Chem.* **2000**, *368*, 4-14.
- [194] J. S. Becker; Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and laser ablation ICP-MS for isotope analysis of long-lived radionuclides; *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *242*, 183-195.
- [195] C. Pickhardt, H. J. Dietze, J. S. Becker; Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for direct isotope ratio measurements on solid samples; *Int. J. Mass Spectrom.* **2005**, *242*, 273-280.
- [196] S. F. Durrant, N. I. Ward; Recent biological and environmental applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS); *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, *20*, 821-829.
- [197] S. Hu, Z. Zhang, Z. Hu, Z. Xing, X. Zhang; Detection of Multiple Proteins on One Spot by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry and Application to Immuno-Microarray with Element-Tagged Antibodies; *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 923-929.
- [198] P. H. Roos, A. Venkatachalam, A. Manz, L. Waentig, C. U. Koehler, N. Jakubowski; Detection of electrophoretically separated cytochromes P450 by element-labelled monoclonal antibodies via laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 1135-1147.
- [199] J. S. Becker; Bioimaging of metals in brain tissue from micrometre to nanometre scale by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: State of the art and perspectives; *Int. J. Mass Spectrom.* **2010**, *289*, 65-75.
- [200] J. S. Becker, A. Matusch, C. Palm, D. Salber, K. A. Morton, J. S. Becker; Bioimaging of metals in brain tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) and metallomics; *Metallomics : integrated biometal science* **2010**, *2*, 104-111.
- [201] D. Smith, P. R. Cromey; An inexpensive, bakeable quadrupole mass spectrometer; *J. Sci. Instrum.* **1968**, *1*, 523-527.
- [202] S. Rosati, R. J. Rose, N. J. Thompson, E. van Duijn, E. Damoc, E. Denisov, A. Makarov, A. J. Heck; Exploring an orbitrap analyzer for the characterization of intact antibodies by native mass spectrometry; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 12992-12996.
- [203] J. Snijder, R. J. Rose, D. Veessler, J. E. Johnson, A. J. Heck; Studying 18 MDa virus assemblies with native mass spectrometry; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 4020-4023.

- [204] M. Karas, F. Hillenkamp; Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons; *Anal. Chem.* **1989**, *60*, 2299-2301.
- [205] I. Rodushkin, M. D. Axelsson; Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part III. Direct analysis by laser ablation; *Sci. Total Environ.* **2003**, *305*, 23-39.
- [206] M. E. McComb, H. Perreault; Design of a sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry probe for operation with a Z-SprayTM ionization source; *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1354-1362.
- [207] J. J. Kirkland, C. H. J. Dilks, S. W. Rementer; Molecular Weight Distributions of Water-Soluble Polymers by Flow Field-Flow Fractionation; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1295-1303.
- [208] D. Roessner, W. M. Kulicke; On-line coupling of flow field-flow fractionation and multi-angle laser light scattering; *J. Chromatogr. A* **1994**, *687*, 249-258.
- [209] J. M. Schurr, V. Blommfield; Dynamic Light Scattering of Biopolymers and Biocolloids; *Crit. Rev. Biochem.* **1977**, *4*, 371-431.
- [210] D. W. Cleveland, S. G. Fischer, M. W. Kirschner, U. K. Laemmli; Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis; *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 1102-1106.
- [211] B. R. Oakley, D. R. Kirsch, N. R. Morris; A Simplified Ultrasensitive Silver Stain for Detecting Proteins in Polyacrylamide Gels; *Anal. Biochem.* **1980**, *105*, 361-363.
- [212] R. J. Braun, N. Kinkl, M. Beer, M. Ueffing; Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins; *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1033-1045.
- [213] K. K. Han, C. Richard, G. Y. Zhang, A. Delacourte; Sequence Homology Analysis of Proteins by Chemical Cleavages: Using a Mono and Two Dimensional Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamid Gel Electrophoresis; *Int. J. Biochem.* **1986**, *18*, 1073-1082.
- [214] A. Görg, C. Obermeier, G. Boguth, A. Harder, B. Scheibe, R. Wildgruber, W. Weiss; The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients; *Electrophoresis* **2000**, *21*, 1037-1053.
- [215] A. Gorg, W. Weiss, M. J. Dunn; Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics; *Proteomics* **2004**, *4*, 3665-3685.
- [216] N. Sood, D. K. Chaudhary, A. Singh, G. Rathore; Monoclonal antibody to serum immunoglobulins of *Clarias batrachus* and its application in immunoassays; *Gene* **2012**, *511*, 411-419.
- [217] J. Szpunar, R. Lobinski; Species-Selective Analysis for Metal-Biomacromolecular Complexes using Hyphenated Techniques; *Pure Appl. Chem.* **1999**, *71*, 899-918.
- [218] D. M. Strauss, J. Gorrell, M. Plancarte, G. S. Blank, Q. Chen, B. Yang; Anion exchange chromatography provides a robust, predictable process to ensure viral safety of biotechnology products; *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *102*, 168-175.
- [219] H. Towbin, J. Gordon; Immunoblotting and Dot Immunobinding - Current Status and Outlook; *J. Immunol. Methods* **1984**, *72*, 313-340.
- [220] J. Burnie, R. C. Matthews; Immunoblot analysis: a new method for fingerprinting hospital pathogens; *J. Immunol. Methods* **1987**, *100*, 41-46.
- [221] D. R. Harper, K. Ming-Liu, H. Kangro; Protein blotting: ten years on; *J. Virol. Methods* **1990**, *30*, 25-39.
- [222] S. D. Müller, R. A. Diaz-Bone, J. Felix, W. Goedecke; Detection of specific proteins by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) using gold cluster labelled antibodies; *J. Anal. At. Spectrom.* **2005**, *20*, 907-911.
- [223] C. C. Chery, D. Gunther, R. Cornelis, F. Vanhaecke, L. Moens; Detection of metals in proteins by means of polyacrylamide gel electrophoresis and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: application to selenium; *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3305-3313.
- [224] J. Klose, U. Kobalz; Two-dimensional electrophoresis of proteins: An updated protocol and implications for a functional analysis of the genome; *Electrophoresis* **1995**, *16*, 1034-1059.

- [225] B. Jachimska, M. Wasilewska, Z. Adamczyk; Characterization of Globular Protein Solutions by Dynamic Light Scattering, Electrophoretic Mobility, and Viscosity Measurements; *Langmuir* **2008**, *24*, 6866-6872.
- [226] D. Nebija, H. Kopelent-Frank, E. Urban, C. R. Noe, B. Lachmann; Comparison of two-dimensional gel electrophoresis patterns and MALDI-TOF MS analysis of therapeutic recombinant monoclonal antibodies trastuzumab and rituximab; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *56*, 684-691.
- [227] C. A. Boswell, D. B. Tesar, K. Mukhyala, F. P. Theil, P. J. Fielder, L. A. Khawli; Effects of Charge on Antibody Tissue Distribution and Pharmacokinetics; *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 2153-2163.
- [228] G. Xiao, P. V. Bondarenko; Identification and quantification of degradations in the Asp–Asp motifs of a recombinant monoclonal antibody; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, *47*, 23-30.
- [229] M. C. Garcia, A. C. Hogenboom, H. Zappey, H. Irth; Effect of the mobile phase composition on the separation and detection of intact proteins by reversed-phase liquid chromatography–electrospray mass spectrometry; *J. Chromatogr. A* **2002**, *957*, 187-199.
- [230] A. Kharlamova, J. C. DeMuth, S. A. McLuckey; Vapor treatment of electrospray droplets: evidence for the folding of initially denatured proteins on the sub-millisecond time-scale; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2012**, *23*, 88-101.
- [231] C. M. Dobson; Principles of protein folding, misfolding and aggregation; *Semin. Cell Dev. Biol.* **2004**, *15*, 3-16.
- [232] R. K. Brummitt, D. P. Nesta, L. Chang, S. F. Chase, T. M. Laue, C. J. Roberts; Nonnative aggregation of an IgG1 antibody in acidic conditions: part 1. Unfolding, colloidal interactions, and formation of high-molecular-weight aggregates; *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 2087-2103.
- [233] A. R. McKay, B. T. Ruotolo, L. L. Ilag, C. V. Robinson; Mass Measurements of Increased Accuracy Resolve Heterogeneous Populations of Intact Ribosomes; *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 11433-11442.
- [234] L. Fornelli, E. Damoc, P. M. Thomas, N. L. Kelleher, K. Aizikov, E. Denisov, A. Makarov, Y. O. Tsybin; Analysis of intact monoclonal antibody IgG1 by electron transfer dissociation Orbitrap FTMS; *Mol. Cell Proteomics* **2012**, *11*, 1758-1767.
- [235] S. Nicolardi, A. M. Deelder, M. Palmblad, Y. E. van der Burgt; Structural analysis of an intact monoclonal antibody by online electrochemical reduction of disulfide bonds and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry; *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 5376-5382.
- [236] Z. Zhang, H. Pan, X. Chen; Mass spectrometry for structural characterization of therapeutic antibodies; *Mass Spectrom. Rev.* **2009**, *28*, 147-176.
- [237] M. A. Gomes Heleno, P. A. Baldasso, L. A. Ponce-Soto, S. Marangoni; Biochemical characterization and pharmacological properties of new basic PLA2 BrTX-I isolated from *Bothrops roedingeri* (Roedinger's Lancehead) Mertens, 1942, snake venom; *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 591470.
- [238] J. K. Wright, J. Tschopp, J. Jaton; Preparation and Characterization of Chemically Defined Oligomers of Rabbit Immunoglobulin G Molecules for the Complement Binding Studies; *Biochem. J.* **1980**, *187*, 767-774.
- [239] J. Liu, M. D. Nguyen, J. D. Andya, S. J. Shire; Reversible self-association increases the viscosity of a concentrated monoclonal antibody in aqueous solution; *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 1928-1940.
- [240] J. K. Kim, M. F. Tsen, V. Ghetie, E. S. Ward; Evidence That The Hinge Region Plays A Role In Maintaining Serum Levels Of The Murine IgG1 Molecule; *Mol. Immunol.* **1995**, *32*, 467-475.
- [241] S. Jespersen, W. M. A. Niessen, T. U. R., J. van der Greef; Basic Matrices in the Analysis of Non-covalent Complexes by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 1088-1093.
- [242] M. Weitzhandler, M. Hardy, M. S. Co, N. Avdalovic; Analysis of Carbohydrates on IgG Preparations; *J. Pharm. Sci.* **1994**, *83*, 1670-1675.

- [243] Y. Mimura, P. R. Ashton, N. Takahashi, D. J. Harvey, R. Jefferis; Contrasting glycosylation profiles between Fab and Fc of a human IgG protein studied by electrospray ionization mass spectrometry; *J. Immunol. Methods* **2007**, *326*, 116-126.
- [244] J. C. Le, P. V. Bondarenko; Trap for MABs: characterization of intact monoclonal antibodies using reversed-phase HPLC on-line with ion-trap mass spectrometry; *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2005**, *16*, 307-311.
- [245] S. Kozlowski, P. Swann; Current and future issues in the manufacturing and development of monoclonal antibodies; *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58*, 707-722.
- [246] D. Filpula; Antibody engineering and modification technologies; *Biomol. Eng.* **2007**, *24*, 201-215.
- [247] L. W. Dick, Jr., C. Kim, D. Qiu, K. C. Cheng; Determination of the origin of the N-terminal pyro-glutamate variation in monoclonal antibodies using model peptides; *Biotechnol. Bioeng.* **2007**, *97*, 544-553.
- [248] L. Huang, S. Biolsi, K. R. Bales, U. Kuchibhotla; Impact of variable domain glycosylation on antibody clearance: an LC/MS characterization; *Anal. Biochem.* **2006**, *349*, 197-207.
- [249] A. Lim, A. Reed-Bogan, B. J. Harmon; Glycosylation profiling of a therapeutic recombinant monoclonal antibody with two N-linked glycosylation sites using liquid chromatography coupled to a hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometer; *Anal. Biochem.* **2008**, *375*, 163-172.
- [250] D. Benda, G. Schwarz, S. Beck, M. W. Linscheid; Quantification of intact covalently metal labeled proteins using ESI-MS/MS; *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 13-18.
- [251] L. Waentig, Technische Universität Dortmund (Dortmund), **2010**.
- [252] A. S. Kruspe, Y. Katsman, D. Sakac, C. Chagneau, A. Glistvain, R. F. Langler, D. R. Branch; Reduction of disulfide bonds within anti-D results in enhanced Fcγ receptor blockade; *Transfusion* **2009**, *49*, 928-936.
- [253] T. B. Farmer, R. M. Caprioli; Determination of Protein–Protein Interactions by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; *J. Mass Spectrom.* **1998**, *33*, 697-704.
- [254] B. Jansson, M. Uhlen, P. Nygren; All individual domains of staphylococcal protein A show Fab binding; *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **1998**, *20*, 69-78.
- [255] S. Hann, G. Koellensperger, C. Obinger, P. G. Furtmüller, G. Stingeder; SEC-ICP-DRCMS and SEC-ICP-SFMS for determination of metal-sulfur ratios in metalloproteins; *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **2004**, *19*, 74-79.